

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

**El fenotipo "basal-her2" en el cáncer de mama: caracterización
clínico-molecular e implicaciones terapéuticas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Begoña Martín Castillo

Directores

**Javier A. Menéndez
Ramón Colomer Bosch**

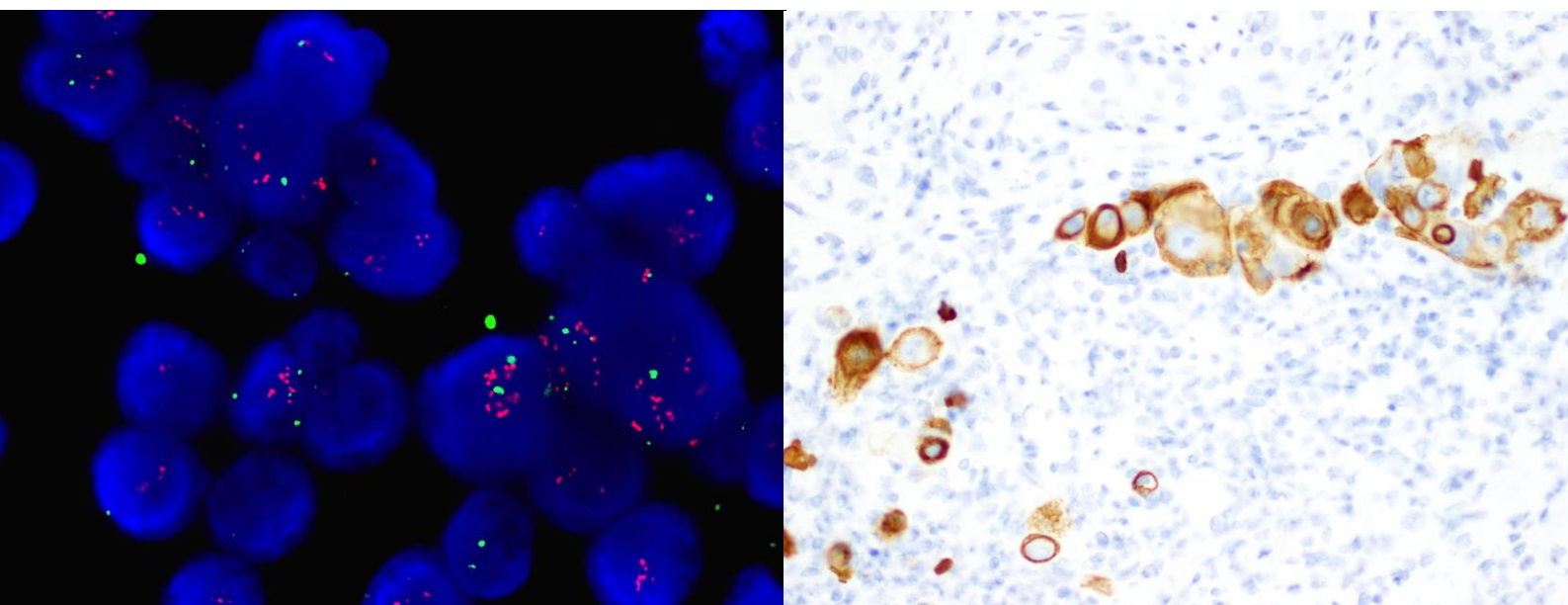
Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE**
MADRID

TESIS DOCTORAL



**EL FENOTIPO “BASAL-HER2” EN EL CÁNCER DE MAMA:
CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR E
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

María Begoña Martín Castillo

Madrid, Octubre 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID**

**EL FENOTIPO “BASAL-HER2” EN EL CÁNCER DE MAMA:
CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR E
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**

Tesis presentada por

María Begoña Martín Castillo

Para optar al Grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

Directores de la Tesis

Dr. Javier A. Menéndez

Dr. Ramon Colomer Bosch

Madrid, 12 de Octubre de 2015



Institut Català d'Oncologia



INFORME de los DIRECTORES de la TESIS

D. JAVIER ABEL MENÉNDEZ MENÉNDEZ, Doctor en Bioquímica y Biología Molecular, Jefe del Laboratorio de Investigación Translacional del Instituto Catalán de Oncología de Gerona y D. RAMON COLOMER BOSCH, Doctor en Medicina y Cirugía, Jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de La Princesa de Madrid

Hacen constar,

Que, Dña. MARÍA BEGOÑA MARTÍN CASTILLO ha realizado bajo su dirección y supervisión el proyecto de investigación titulado: **EL FENOTIPO “BASAL-HER2” EN EL CÁNCER DE MAMA: CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS**. Es su intención presentarlo como Trabajo de Tesis y optar para ello al Título de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular por la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Por la dedicación, rigor y seriedad de dicho trabajo puede ampliamente presentarse para tal fin. Los abajo firmantes quieren informar asimismo que han dirigido personalmente los estudios reflejados en el mismo. Consideran que este trabajo de investigación reúne los requisitos de originalidad y calidad mínimamente necesarios para ser presentado y defendido.

Y para que así conste, lo avalan y firman el presente documento en Madrid, a 12 de Octubre de 2015:

Fdo.

Dr. Javier A. Menéndez
DNI: 32878534B

Fdo.

Dr. Ramon Colomer Bosch
DNI: 46112874J

*A mis padres, a quienes debo todo lo que soy
A Javier, Agua y Noam, que dan sentido a mi vida*

Mi admiración a todos los pacientes oncológicos
Mi gratitud a todos los que altruistamente participan en la lucha contra el cáncer

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Javier A. Menéndez, director de este trabajo, por su ejemplar dirección, por su dedicación y por su inestimable ayuda. Por su guía, por su genial labor didáctica. Por transmitirme valores tan importantes en la labor investigadora como son el esfuerzo, el detalle, y siempre, la imaginación. Mi profunda admiración y gratitud.

Al Dr. Ramon Colomer, co-director de la tesis, por darme la oportunidad para incorporarme al Instituto Catalán de Oncología, donde he podido crecer y desarrollarme personal y profesionalmente.

Al Dr. Eugeni López-Bonet, por su inestimable ayuda para la realización de los estudios de inmunohistoquímica y su interés mostrado a lo largo de todo el proyecto. Gracias por tu actitud siempre positiva y por tus ánimos en la recta final.

A la Dra. María Buxó, por su ayuda desinteresada en la parte estadística.

A todos los compañeros del Grupo de Investigación, por su ayuda, dedicación y entusiasmo en la realización de este trabajo.

A los compañeros del Instituto Catalán de Oncología, y del Hospital Universitario Dr. Josep Trueta, a todos aquellos que de una u otra forma habéis ayudado al desarrollo de este trabajo. Gracias.

A mis Amigas las “boticarias”, ¡sois pieza insustituible en mi puzzle! El tiempo y la distancia son pruebas irrefutables de que ésto es Amistad. He podido sentir vuestra alegría y vuestro aliento en este período tan importante de mi vida, como en todos. Sois las mejores. ¡Gracias por estar siempre!

A Ana, mi querida doctora “Marhuendi”, otro ejemplo de verdadera amistad. Por su risa contagiosa, por tantos momentos especiales vividos: No cambies nunca.

A mis padres Francisco y Begoña, mis hermanos Nuria y Javier, y a toda mi familia, por su apoyo siempre, por su ayuda y afecto imprescindibles.

A mis hijos, por ese tiempo robado dedicado a esta tesis. Os adoro: vuestra sonrisa siempre hará girar el mundo.

Y sobre todo, a ti, el mejor compañero de viaje. Gracias por entregarme tu amor cada día. Gracias por el mundo que juntos hemos creado, ¡es maravilloso estar en él! Es nuestra tesis, te la debo a ti. Gracias mi amor.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	16
ABREVIATURAS	18
LISTADO DE PUBLICACIONES	22

ÍNDICE DE CONTENIDOS

SUMMARY	24
RESUMEN	28
I. INTRODUCCIÓN	33
I.1 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER Y ONCOGENES	34
I.1.1. Las características (“hallmarks”) del cáncer	34
I.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE MAMA Y FACTORES DE RIESGO	38
I.2.1. Epidemiología	38
I.2.2. Factores de riesgo	39
I.3. EL EPITELIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA HUMANA	41
I.4. EXPRESIÓN DE CITOQUERATINAS EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL	43
I.5. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL CÁNCER DE MAMA	44
I.6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE MAMA	46
I.6.1. Subtipos moleculares del cáncer de mama	49
I.6.1.1. Subtipo Luminal	49
I.6.1.2. Subtipo HER2-enriquecido	50
I.6.1.3. Subtipo Basal	51
I.6.1.4. Subtipo “Normal”	53
I.6.1.5. Subtipo “bajo en claudina”	53

I.6.2. Impacto de los subtipos intrínsecos en el comportamiento del cáncer de mama	53
I.7. CÁNCER DE MAMA HER2-positivo	56
I.7.1. La familia HER	56
I.7.2. Papel del oncogén HER2 en el cáncer de mama	59
I.7.3. Terapias anti-HER2: Trastuzumab (Herceptin)	60
I.7.4. Resistencia a trastuzumab	63
I.7.5. Nuevas terapias moleculares en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo	64
I.8. LA HIPÓTESIS DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES (CMTs)	67
I.8.1. Origen de las CMTs	68
I.8.2. Células madre mamarias	71
I.8.3. CMTs en el cáncer de mama	72
I.8.4. CMTs, plasticidad celular y TEM	74
I.8.5. CMTs, resistencia al tratamiento y nuevas terapias anti-CMT	78
II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	79
El subtipo Basal-HER2+ de cáncer de mama: Evidencias preliminares	80

El subtipo Basal-HER2+ de cáncer de mama: Necesidad de una caracterización clínico-molecular y de sus implicaciones terapéuticas	81
III. HIPÓTESIS	83
IV. OBJETIVOS	85
V. RESULTADOS	87
Estudio #1.	88
Martin-Castillo B , Lopez-Bonet E, Buxó M, Dorca J, Tuca-Rodríguez F, Ruano MA, Colomer R, Menendez JA. <i>Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant Basal-HER2 subtype of breast cancer.</i> Oncotarget . 2015 Mar 30;6(9):7104-7122. PMID: 25742793	
Estudio #2	89
Martin-Castillo B , Lopez-Bonet E, Cuyàs E, Viñas G, Pernas S, Dorca J, Menendez JA. <i>Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas.</i> Oncotarget . 2015. [Epub ahead of print]	
Estudio #3.	90
Cuyàs E*, Martin-Castillo B* , Corominas-Faja B, Massaguer A, Bosch-Barrera J, Menendez JA. <i>Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties.</i> Cell Cycle . 2015 May 13:0. [Epub ahead of print] PMID: 25970790	
*Igual contribución	
VI. DISCUSIÓN GENERAL	91
Firmas pronósticas y predictivas en tumores HER2+ tempranos	92
Tumores HER2+ y de tipo basal: ¿Dos entidades moleculares mutuamente excluyentes?	93
El fenotipo “basal-HER2+”: Valor pronóstico en tumores de mama HER2+	95

El fenotipo “basal-HER2+”: Valor predictivo en tumores de mama HER2+	97
Mecanismos moleculares de resistencia a trastuzumab en tumores “basal-HER2+”	99
Subtipos moleculares intrínsecos, estados de CMTs y tumores cHER2+: Un nuevo modelo de integración del valor pronóstico y predictivo de HER2 en el cáncer de mama	101
Estados epiteliales y mesenquimales de las CMTs en la resistencia primaria y secundaria a trastuzumab en tumores cHER2+	103
Implicaciones terapéuticas de la heterogeneidad tumoral en la respuesta a trastuzumab	106
Nuevos abordajes terapéuticos de los tumores basal/cHER2+	108
VII. CONCLUSIONES FINALES	112
VIII. BIBLIOGRAFÍA	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Alteraciones en las células tumorales	35
Figura 2. Características emergentes del cáncer	36
Figura 3. Modelos de crecimiento tumoral exponencial (rojo) y crecimiento Gompertziano (azul)	38
Figura 4. Tipos celulares y marcadores en la glándula mamaria	44
Figura 5. Secuencia de eventos en el desarrollo del cáncer de mama	45
Figura 6. Método de obtención de las firmas moleculares	47
Figura 7. Método de obtención de las firmas moleculares	48
Figura 8. Análisis de HER2 en cáncer de mama	51
Figura 9. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier basadas en tinción IHQ de citoqueratinas basales	52
Figura 10. Características clínico-patológicas de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama	54
Figura 11. Correspondencia entre las características histopatológicas y la clasificación molecular del cáncer de mama	55
Figura 12. Dimerización y activación de los receptores de la familia HER	56
Figura 13. Transducción de señales por la familia de receptores HER	57
Figura 14. Supervivencia de los pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar en relación con el estado de expresión del receptor HER2	59
Figura 15. Trastuzumab (Herceptin)	61
Figura 16. Mecanismos de acción de trastuzumab (Herceptin)	62
Figura 17. Terapias moleculares en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo	64
Figura 18. Sitios de unión de los anticuerpos monoclonales anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab	65
Figura 19. Analogía de la jerarquía celular de un tejido sano y de un tejido tumoral	68
Figura 20. Representación gráfica de los modelos tradicional y de las CMT del cáncer	69

Figura 21. Representación gráfica de los modelos de formación de las CMTs	70
Figura 22. Modelos y marcadores para el estudio de células madre de cáncer de mama	74
Figura 23. Interconversión de los estados fenotípicos en las poblaciones de células tumorales	75
Figura 24. Modelo estático <i>versus</i> dinámico de las CMTs	76
Figura 25. Asociación de los subtipos moleculares de líneas celulares de cáncer de mama con la respuesta primaria al anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos histológicos del cáncer de mama	44
Tabla 2. Subtipos de cáncer de mama determinados por perfiles de expresión génica e inmunofenotipado empleando seis biomarcadores	49

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ADCC	del inglés <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> Ácido
ADN	Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementario
AKT	del inglés <i>Protein Kinase B</i>
ALDH1	Aldehído Deshidrogenasa 1
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
BC	del inglés <i>Breast Cancer</i>
BRCA1	del inglés <i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	del inglés <i>Breast Cancer 2</i>
CEP17	del inglés <i>Centromeric Probe for Chromosome 17</i>
CK	Citoqueratina
c-Kit	del inglés <i>Stem Cell Factor Receptor</i>
CIT	Célula Iniciadora de Tumor
CMA	Célula Madre Adulta
CMT	Célula Madre Tumoral
CMT-E	Célula Madre Tumoral-Epitelial
CMT-M	Célula Madre Tumoral-Mesenquimal
CPT	Célula Propagadora de Tumor
CSC	del inglés <i>Cancer Stem Cell</i>
E-CSC	del inglés <i>Epithelial-Cancer Stem Cell</i>
EGFR	del inglés <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	del inglés <i>Epithelial-mesenchymal Transition</i>

EpCAM	del inglés <i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ER	del inglés <i>Estrogen Receptor</i>
ERBB2	del inglés <i>Erb-b2 Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
FACS	del inglés <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FATs	Fibroblastos asociados a tumor
FDA	del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FISH	del inglés <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
GTP	del inglés <i>Guanosine Triphosphate</i>
HDPP	del inglés <i>HER2-derived Prognostic Predictor</i>
HER	del inglés <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HER2	del inglés <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor type 2</i>
cHER2	HER2 clínico
Hsp90	del inglés <i>Heat Shock Protein 90</i>
IARC	del inglés <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF-1R	del inglés <i>insulin-like Growth Factor-1 Receptor</i>
IgG1	Inmunoglobulina G1
IHQ	Inmunohistoquímica
iPSCs	del inglés <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
KD	Kilodalton
MAPK	del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
M-CSC	del inglés <i>Mesenchymal-Cancer Stem Cell</i>
MEK	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mTOR	del inglés <i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MUC-4	Mucina-4

O₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
pCR	del inglés <i>pathological Complete Response</i>
PCR	del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFR	del inglés <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PI3K	del inglés <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PR	del inglés <i>Progesterone Receptor</i>
PTEN	del inglés <i>Phosphatase and Tensin Homologue</i>
RE	Receptor de Estrógeno
RH	Receptor Hormonal
RNA	del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>
RP	Receptor de Progesterona
RTK	del inglés <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>
SL	del inglés <i>Stem-Like cells</i>
SP	del inglés <i>Side Population</i>
T-DM1	ado-trastuzumab emtansine
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TME	Transición mesénquima-epitelio
TGF β	del inglés <i>Transforming Growth Factor beta</i>
TKI	del inglés <i>Tyrosine Kinase Inhibitor</i>
TNM	Tamaño del tumor, Nódulos, Metástasis
UDLT	Unidad Ducto Lobulillar Terminal
VEGFR1	del inglés <i>Vascular Endotelial Growth Factor Receptor 1</i>

LISTADO DE PUBLICACIONES

Este trabajo de tesis doctoral incluye las siguientes publicaciones:

Estudio #1

Martin-Castillo B, Lopez-Bonet E, Buxó M, Dorca J, Tuca-Rodríguez F, Ruano MA, Colomer R, Menendez JA. *Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant Basal-HER2 subtype of breast cancer*. **ONCOTARGET**. 2015 Mar 30;6(9):7104-7122. PMID: 25742793. DOI: 10.18632/oncotarget.3106. **Factor de Impacto 2014/2015: 6.359**

Estudio #2

Martin-Castillo B, Lopez-Bonet E, Cuyàs E, Viñas G, Pernas S, Dorca J, Menendez JA. *Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas*. **ONCOTARGET**. 2015. [Epub ahead of print] DOI: 10.18632/oncotarget.6094. **Factor de Impacto 2014/2015: 6.359**

Estudio #3

Cuyàs E*, **Martin-Castillo B***, Corominas-Faja B, Massaguer A, Bosch-Barrera J, Menendez JA. *Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties*. **CELL CYCLE**. 2015 May 13:0. [Epub ahead of print] PMID: 25970790. DOI:10.1080/15384101.2015.1044173. **Factor de Impacto 2014/2015: 4.565**

*Igual contribución

SUMMARY

SUMMARY

THE “BASAL-HER2” PHENOTYPE IN BREAST CANCER: CLINICO-MOLECULAR CHARACTERIZATION AND THERAPEUTIC IMPLICATIONS

Clinically HER2+ (cHER2+) breast cancer (BC), as exclusively determined by immunohistochemistry of HER2 protein overexpression and/or fluorescence *in situ* hybridization of *HER2* gene amplification, has been largely considered a single disease entity in terms of clinical outcome and in the susceptibility to the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin). However, although the adjuvant/neoadjuvant use of the trastuzumab has been shown to significantly reduce recurrence risk when added to standard chemotherapy in women with early-stage cHER2+ BC, not all cases derive similar benefit from trastuzumab because a significant number of cHER2+ BC patients develop disease recurrence. Unfortunately, the identification of a robust clinical predictor of trastuzumab benefit, including HER2 itself, has proven challenging in the adjuvant/neoadjuvant setting. Thus, we suggest that a new generation of research needs to refine the prognostic taxonomy of cHER2+ BC and develop easy-to-use, clinic-based prediction algorithms to distinguish between good- and poor- responders to trastuzumab-based therapy *ab initio*.

This study offered two hypotheses: 1.) HER2 overexpression can unexpectedly take place in a molecular background owned by basal-like BC (a commonly HER2-negative BC subtype which possesses many epithelial-mesenchymal transition (EMT) characteristics and exhibits robust cancer stem cell [CSC]-like features), thus generating a so-called basal/cHER2+ BC subtype; 2.) the basal/cHER2+ phenotype confers poor prognosis and delineates a subgroup of intrinsically aggressive cHER2+ BC with primary resistance to trastuzumab. This study has four goals: 1.) To confirm that the basal/cHER2+ phenotype can be immunohistochemically identified by the co-expression of the basal cytokeratin CK5/6 in HER2-overexpressing tumors; 2.) to assess the impact of the basal/cHER2+ phenotype on the overall survival, disease-free survival, and time to treatment failure of HER2-positive BC patients treated with trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapies; 3.) to develop new theory to explain how the poor prognosis and *de novo* resistance to trastuzumab in basal/HER2+ tumors can be explained in terms of their enrichment with mesenchymal features

including the CD44⁺CD24^{-/low} signature of CSCs; and 4.) to offer new therapeutic approaches that could help clinicians to successfully manage primary resistance to trastuzumab in basal/cHER2+ BC.

First, we investigated the prognostic value of the basal/cHER2+ phenotype in HER2-overexpressing tumors. Our retrospective cohort study of a consecutive series of 152 HER2+ primary invasive ductal breast carcinomas first confirmed the existence of a distinct subgroup co-expressing HER2 protein and basal cytokeratin markers CK5/6, the so-called basal/cHER2+ phenotype. Basal/cHER2+ phenotype ($\geq 10\%$ of cells showing positive CK5/6 staining), but not estrogen receptor status, was significantly associated with inferior overall survival by univariate analysis and predicted worsened disease free survival after accounting for strong prognostic variables such as tumor size at diagnosis in stepwise multivariate analysis. Second, we investigated the predictive value of the basal/cHER2+ phenotype. In the sub-cohort of HER2+ patients treated with trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapy, a CK5/6-based fingerprint using a 10% positivity cutoff to define a *bona fide* basal/cHER2+ phenotype was found to be the sole independent prognostic marker for a significantly inferior time to treatment failure in multivariate analysis. The CK5/6-defined basal/cHER2+ immunohistochemical algorithm could be used as surrogate of EMT and CSC-like gene signatures contributing to the poor outcomes in basal/cHER2+ tumors because the sole re-classification of HER2+ tumors by the expression of the EMT transcription factors and CSC markers SNAI2 (SLUG) and TWIST on a publicly accessible gene expression and survival information database and online tool (Kaplan-Meier plotter; <http://kmplot.com/>) was sufficient to predict a significantly inferior relapse free survival and distant metastasis free survival in the EMT-like/HER2+ patient cohort. Third, we proposed a framework for predicting the response of cHER2+ to trastuzumab that integrates the molecular distinctions of intrinsic BC subtypes with recent knowledge on CSC biology. The differential enrichment of trastuzumab-responsive ALDH+ epithelial (E)-CSCs *versus* trastuzumab-refractory CD44⁺CD24^{-/low} mesenchymal (M)-CSCs in each intrinsic subtype of BC (i.e., luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal, and claudin-low) was proposed to explain both the clinical behavior and the primary efficacy of trastuzumab cHER2+, including the poor prognosis/trastuzumab-resistant subgroup of basal/cHER2+ tumors. Fourth, we

explored the molecular peculiarities of the mesenchymal compartment (i.e., M-CSCs and mesenchymal-like bulk cancer cells) to offer therapeutic approaches that might circumvent primary resistance to trastuzumab in basal/cHER2+ BC. Given the highly endocytic activity of CD44⁺CD24^{-/low} mesenchymal-like CSCs, we propose that the otherwise irrelevant HER2 in basal/cHER2+ tumors would allow a rapid and targeted delivery of cytotoxic drugs to M-CSCs by employing antibody-drug conjugates such as T-DM1 (ado-trastuzumab emtansine). Given the high protein synthesis rates observed in slowly proliferating cancer cells with mesenchymal expression signatures, our discovery that anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics targeting ribosomal protein synthesis were highly active in killing basal-like BC cells suggests that some microbicides could be repurposed to attack the mesenchymal bulk tumors cells in basal/cHER2+ BC.

This study concluded that: 1.) cHER2+ BC can no longer be considered a single BC disease entity in terms of clinical outcome and trastuzumab responsiveness; 2.) a CK5/6-based immunohistochemical fingerprint may provide a simple, rapid, and accurate method for re-classifying women diagnosed with cHER2+ breast cancer in a manner that can improve prognosis and therapeutic planning in patients with clinically aggressive basal/cHER2+ tumors; 3.) a reclassification of cHER2+ tumors based on basal (e.g., CK5/6) and CSC-related markers (e.g., ALDH and CD44⁺CD24^{-/low}) might inform on their *a priori* CSC-determined sensitivity to trastuzumab, thus providing a better delineation of the predictive value of cHER2+ in BC patients; and 4.) anti-HER2-drug conjugates and ribosome-targeting antibiotics might represent valuable therapeutic approaches to clinically manage basal/cHER2+ BC, who are not likely to benefit from trastuzumab-based combination therapies.

RESUMEN

RESUMEN

EL FENOTIPO “BASAL-HER2” EN EL CÁNCER DE MAMA: CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-MOLECULAR E IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

El cáncer de mama clínicamente HER2+ (cHER2+), determinado exclusivamente mediante inmunohistoquímica de la sobre-expresión de la proteína HER2 y/o fluorescencia de hibridación *in situ* de la amplificación del gen HER2, ha sido considerado clásicamente como una única enfermedad en términos de pronóstico clínico y sensibilidad al anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab (Herceptin). Sin embargo, aunque el uso adyuvante y neoadyuvante de trastuzumab reduce de forma significativa el riesgo de recaída en mujeres con cáncer de mama temprano cHER2+ cuando se añade a la quimioterapia estándar, no todos los casos obtienen el mismo beneficio si se tiene en cuenta el elevado número de pacientes que desarrollan recurrencia de la enfermedad. Desafortunadamente, la identificación de un predictor clínico robusto indicativo del beneficio de trastuzumab, incluyendo el mismo HER2, continúa siendo en la actualidad un reto en el entorno adyuvante y neoadyuvante de esta enfermedad. Este trabajo sugiere que debería mejorarse el valor pronóstico del cáncer de mama cHER2+ y desarrollar algoritmos predictivos basados en la clínica capaces de distinguir fácilmente y *a priori* los pacientes sensibles y no-sensibles a las terapias basadas en trastuzumab.

Este estudio plantea dos hipótesis: 1). La sobre-expresión de HER2 puede tener lugar en un subtipo molecular de cáncer de mama denominado basal (un subgrupo de tumores hasta ahora considerados como HER2-negativos y enriquecidos con características mesenquimales), generando de esta manera un nuevo fenotipo de cáncer de mama denominado “basal/HER2”; 2). El fenotipo basal/HER2 confiere mal pronóstico y define a un subgrupo de pacientes con cánceres de mama clínicamente HER2+, intrínsecamente agresivos y con resistencia primaria a trastuzumab.

Este estudio tiene cuatro objetivos: 1). Confirmar la existencia de un fenotipo basal/HER2 en el cáncer de mama mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas que detecten la co-expresión de la citoqueratina basal CK5/6 en tumores que sobre-expresan HER2; 2). Medir el impacto del fenotipo basal/HER2 sobre

la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, y el tiempo al fallo de tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2+ tratadas con terapias adyuvantes y neoadyuvantes basadas en trastuzumab; 3). Desarrollar un nuevo modelo teórico que explique como el peor pronóstico y la resistencia *de novo* a trastuzumab de los tumores con fenotipo basal/HER2 puede explicarse en términos de características mesenquimales tales como la firma $CD44^{+}CD24^{-}/bajo$ de las CMTs; y 4). Ofrecer nuevos abordajes terapéuticos en el manejo del cáncer de mama basal/HER2 con resistencia primaria a trastuzumab.

Investigamos en primer lugar el valor pronóstico del fenotipo basal/cHER2+ en los tumores primarios de cáncer de mama que sobre-expresan HER2. Nuestro estudio de cohorte retrospectivo con una serie consecutiva de 152 carcinomas de mama ductales invasivos HER2+ confirmó la existencia de un subgrupo que co-expresaba marcadores de citoqueratinas basales CK5/6 y la proteína HER2, el fenotipo denominado basal/cHER2+. El fenotipo basal/cHER2 ($\geq 10\%$ de células con tinción positiva para CK5/6), pero no el estado del receptor de estrógenos, se asoció de forma significativa con una menor supervivencia global en el análisis univariante y predijo una peor supervivencia libre de enfermedad cuando se tuvieron en consideración fuertes variables pronósticas como el tamaño tumoral al diagnóstico en el análisis multivariante.

Evaluamos en segundo lugar el valor predictivo del fenotipo basal/cHER2+ en los tumores primarios de cáncer de mama que sobre-expresan HER2. En la sub-cohorte de pacientes HER2+ tratados con terapia adyuvante y neoadyuvante basada en trastuzumab, la presencia de CK5/6 empleando un punto de corte de 10% de positividad para definir el fenotipo basal/cHER2+, fue el único marcador independiente capaz de predecir un tiempo inferior al fallo de tratamiento en el análisis multivariante.

El algoritmo inmunohistoquímico definido por citoqueratinas CK5/6 podría ser utilizado como un indicador indirecto de la presencia de firmas genéticas de tipo TEM y CMT, lo que podría contribuir al peor comportamiento de los tumores basal/cHER2+. Así observamos que la simple reclasificación de los tumores HER2+ según los niveles de

expresión de los factores de transcripción de la TEM y marcadores de CMTs SNAI2 (SLUG) y TWIST, haciendo uso de una base de datos pública y *online* que proporciona datos de supervivencia y expresión de genes (Kaplan-Meier plotter; <http://kmplot.com/>), fue suficiente para predecir significativamente una peor supervivencia libre de recaída y supervivencia libre de metástasis en la cohorte de pacientes HER2+/SNAI2 y HER2+/TWIST.

Propusimos en tercer lugar un modelo predictivo de respuesta a trastuzumab en los tumores cHER2+ que integraba las características moleculares de los subtipos intrínsecos del cáncer de mama con el conocimiento más reciente de la biología de las CMTs. Se propuso que el enriquecimiento diferencial de CMTs-E (epiteliales) ALDH+ sensibles a trastuzumab *versus* CMTs-M (mesenquimales) CD44⁺CD24^{-bajo} refractarias a trastuzumab en cada subtipo intrínseco de cáncer de mama (es decir, luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal, y bajo en claudina), explicaba adecuadamente tanto el comportamiento clínico como la eficacia primaria a trastuzumab de los tumores cHER2+, incluyendo el mal pronóstico y la resistencia *de novo* a trastuzumab del subgrupo de tumores basal/cHER2+.

Exploramos finalmente las peculiaridades moleculares del compartimento mesenquimal (es decir, de las CMTs-M y de las células tumorales mesenquimales que conforman el grueso del tumor), para ofrecer opciones terapéuticas capaces de eludir la resistencia primaria a trastuzumab en los carcinomas de mama basal/cHER2+. Por un lado, dada la elevada actividad endocítica de las CMTs de tipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-bajo}, se propuso que HER2 podría ser utilizado para permitir una rápida liberación dirigida de drogas citotóxicas contra las CMTs-M de los tumores basal/cHER2+ mediante el empleo de conjugados droga-anticuerpo tales como T-DM1 (ado-trastuzumab emtansine). Por otro lado, dado las elevadas tasas de síntesis proteica en células tumorales poco proliferativas con firmas de expresión mesenquimal, nuestro hallazgo de que antibióticos anti-protozoarios y anti-bacterianos que bloquean la síntesis de proteínas en los ribosomas mostraron una elevada citotoxicidad en células de cáncer de mama de tipo basal, sugirió que algunos antibióticos podrían reposicionarse para la

eliminación selectiva de las células mesenquimales que pudieran estar presentes en el grueso tumoral de los carcinomas de mama basal/cHER2+.

Este trabajo concluyó que:

- 1.) El cáncer de mama cHER2+ no puede ser considerado como una única enfermedad en términos de pronóstico y de respuesta al tratamiento con trastuzumab.
- 2.) La identificación por inmunohistoquímica de las CKs basales 5/6 podría suponer un método sencillo, rápido y eficaz para reclasificar a las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama cHER2+, lo que mejoraría el pronóstico y el plan terapéutico de aquellas pacientes con tumores agresivos de fenotipo basal/cHER2+.
- 3.) La reclasificación de los tumores de mama cHER2+ en base a la presencia de marcadores basales (p.ej. CK5/6) y/o de marcadores relacionados con las CMTs (p. ej. ALDH y CD44⁺CD24^{-/bajo}) podría informarnos *a priori* de su sensibilidad a trastuzumab, y mejoraría el valor predictivo de HER2+.
- 4.) Un posible abordaje terapéutico para los cánceres de mama basal/cHER2+, que parecen no beneficiarse de las terapias basadas en trastuzumab, podría implicar el uso de conjugados droga-anticuerpo anti-HER2 y antibióticos que inhiben la síntesis proteica.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Biología molecular del cáncer y oncogénesis

La teoría clásica de la oncogénesis propone que el proceso por el que una célula normal se convierte en una célula tumoral implica la adquisición progresiva y secuencial de mutaciones en el ADN, las cuales finalmente producen un daño permanente en el genoma y su transformación maligna (Bertram, 2000). Estas mutaciones pueden dar lugar a la activación de oncogenes (p. ej. factores de crecimiento y sus receptores, moléculas implicadas en la transducción de señales o factores de transcripción), a la inactivación de genes supresores de tumores y/o a la alteración de genes reguladores de la estabilidad genómica (p. ej. genes reguladores de la apoptosis y genes reparadores del ADN) (Solomon y cols., 1991). Este proceso secuencial puede verse acelerado por la presencia de mutaciones hereditarias, que generalmente implican la reducción o ausencia de una correcta reparación del daño en el ADN. Hoy sabemos que no sólo la acumulación de cambios estrictamente genéticos sino también la presencia de alteraciones epigenéticas son las encargadas de dirigir la adquisición del fenotipo maligno. Las alteraciones epigenéticas, definidas como cambios en el estado de expresión en ausencia de alteraciones en la secuencia genética, pueden implicar la metilación y consiguiente inactivación de un gen con función supresora de tumores, lo que puede resultar en una mayor activación del ciclo celular en respuesta a determinadas señales oncogénicas (Esteller, 2008).

I.1.1. Las características (“hallmarks”) del cáncer

El desarrollo de un tumor requiere que las células tumorales, para poder sobrevivir y multiplicarse sin control, sean capaces de escaparse de los mecanismos fisiológicos de regulación que habitualmente están presentes en nuestro organismo (Haagensen, 1973). Las células tumorales, por ejemplo, eluden los mecanismos fisiológicos de diferenciación a la vez que generan señales de crecimiento propias debido a una utilización aberrante de los factores de crecimiento y de sus receptores. Además, las células tumorales son capaces de evadir el sistema inmunitario y de anular los sistemas de muerte celular programada (apoptosis).

En el año 2000, Hanahan y Weinberg describieron originalmente las seis alteraciones fisiológicas esenciales que definen a una célula tumoral (Hanahan y Weinberg, 2000; **Fig. 1**). Estas características (“*hallmarks*”) tumorales son: 1.) El mantenimiento continuo de las señales de proliferación; 2.) la evasión de los supresores del crecimiento; 3.) la activación de la invasión y metástasis; 4.) la evasión de la apoptosis; 5.) la inducción de la angiogénesis; y 6.) la inmortalidad replicativa.

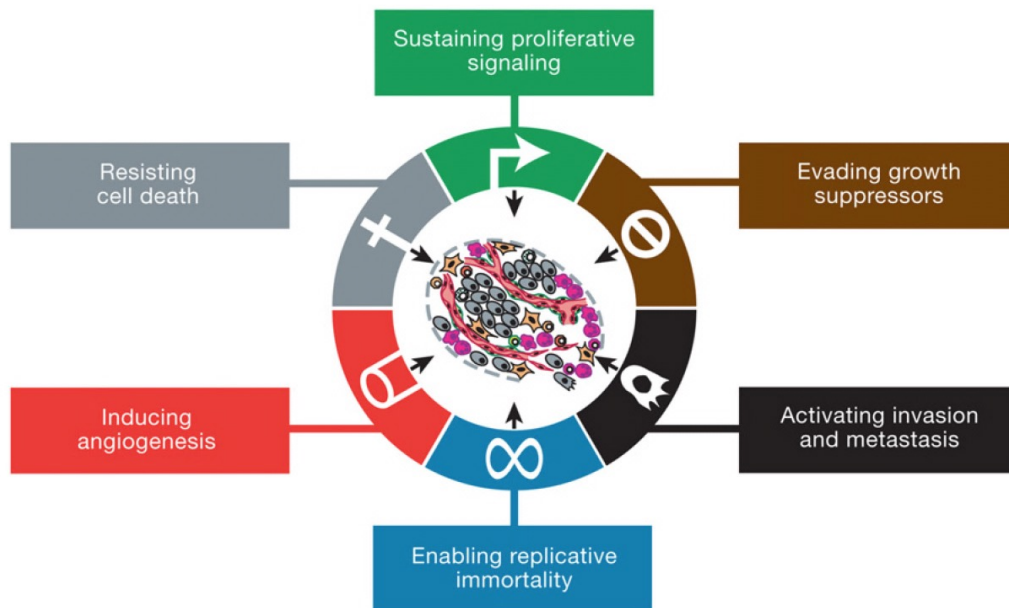


Figura 1. Alteraciones en las células tumorales (extraída de Hanahan y Weinberg, 2011).

En una actualización posterior, los mismos autores propusieron la necesaria implicación de otros procesos tales como la inestabilidad genómica y la inflamación en el desarrollo y mantenimiento de las seis características tumorales originales (Hanahan y Weinberg, 2011). El avance conceptual producido en la última década permitió también la inclusión de otras dos marcas distintivas de las células tumorales: La reprogramación del sistema energético celular (reprogramación metabólica) y la evasión de la destrucción por parte del sistema inmunitario (**Fig. 2**).

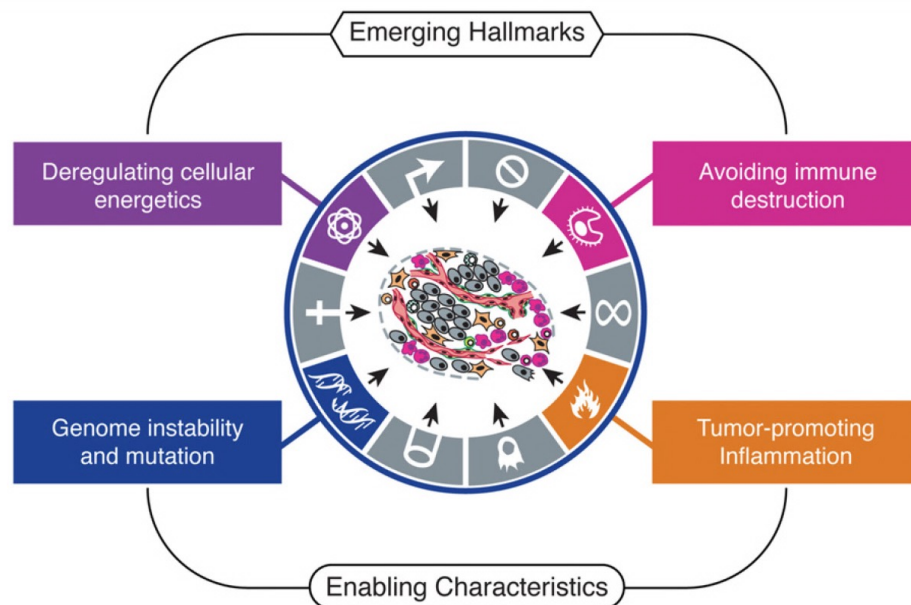


Figura 2. Características emergentes del cáncer (extraída de Hanahan y Weinberg, 2011)

Aunque la aplicabilidad generalizada de todas estas características propias de la célula tumoral pueden ser el catalizador para el desarrollo de nuevas terapias moleculares contra el cáncer, debe tenerse en cuenta que los tumores presentan otra dimensión de complejidad: La presencia de todo un repertorio de células normales que constituye el denominado “microambiente tumoral” (Junttila y de Sauvage, 2013). En realidad, el proceso de invasión y metástasis requiere obligatoriamente de la comunicación e interrelación entre el tumor y el tejido donde se desarrolla y evoluciona. En este sentido, el proceso de metástasis requiere de la participación esencial no solo de moléculas de adhesión presentes en la superficie de las células tumorales que son responsables de las interacciones célula-célula, sino también de las integrinas, encargadas de las interacciones entre la célula tumoral y la matriz extracelular. Las proteasas extracelulares encargadas de la degradación de la matriz extracelular y que pueden ser producidas no solo por las células tumorales sino también por células del estroma y células inflamatorias, son también absolutamente necesarias para el correcto establecimiento de la invasión y metástasis tumoral (Deryugina y Quigley, 2006).

Son varias las teorías que explican el proceso de metástasis (Gupta y Massagué, 2012; Nguyen y Massagué, 2007; Nguyen y cols., 2009; Vanharanta y Massagué, 2013):

1. “*Seed & Soil*”: Cada órgano ofrece unas condiciones distintas para anidar y crecer al proporcionar un ambiente propicio solamente a determinados tipos de células tumorales.
2. “*Homing*”: Cada órgano posee una batería específica de factores quimiotácticos capaces de atraer y facilitar la extravasación y anidamiento de determinadas células malignas circulantes.
3. Barrera física: El tamaño de las células tumorales determina su posible localización.
4. Firma genética: Las células con capacidad metastásica pre-existen en el tumor primario y poseen características genéticas especiales.
5. “*Pre-niche*”: Por ejemplo, células derivadas de la médula ósea que expresan determinados receptores de factores angiogénicos (p.ej. VEGFR1) se asientan en sitios “pre-metastásicos” específicos y son capaces de generar agrupaciones celulares antes de la llegada de las células tumorales.

En cuanto al crecimiento tumoral, son dos los modelos propuestos para explicar la capacidad de crecimiento y división celular de un tejido tumoral:

1. El modelo de *crecimiento exponencial* considera que la lesión tumoral sigue una tasa de multiplicación exponencial, es decir, que la fracción de crecimiento y el tiempo de duplicación se mantienen constantes a lo largo del tiempo.
2. El modelo de *crecimiento Gompertziano* considera que, por el contrario, el tumor crece más rápidamente en las fases iniciales para después disminuir paulatinamente el ritmo de crecimiento a medida que se incrementa el tamaño tumoral (p.ej. debido a la disminución de nutrientes disponibles, falta de O₂, muerte celular, etc.; Collins y cols., 1956; Gilewski y cols., 1996; **Fig. 3**).

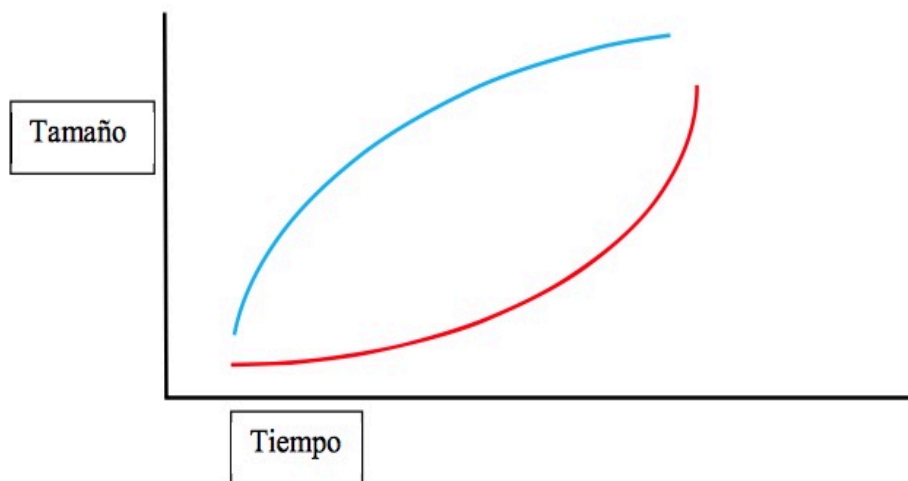


Figura 3. Modelos de crecimiento tumoral exponencial (rojo) y Crecimiento Gompertziano (azul).

I.2. Epidemiología del cáncer de mama y factores de riesgo

I.2.1. Epidemiología

El cáncer de mama es el más común entre las mujeres en todo el mundo, con una incidencia de 1,67 millones de nuevos casos diagnosticados en 2012 (Ferlay y cols., 2013; GLOBOCAN, 2012). En España se diagnostican más de 25.000 nuevos casos al año, lo que representa casi el 30% de todos los tumores del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, con un máximo entre los 45 y los 65. Se estima que el riesgo de padecer cáncer de mama a lo largo de la vida es de, aproximadamente, 1 de cada 8 mujeres.

Las tasas de incidencia del cáncer de mama aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y al diagnóstico cada vez más temprano. El aumento de la incidencia se estima en un 1-2% anual y ha sido constante desde 1960 en los Estados Unidos de Norteamérica. Sin embargo el último informe de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha puesto de manifiesto el vertiginoso aumento que se ha producido tanto en la incidencia (20%) como en la mortalidad (14%) del cáncer de mama en los últimos cuatro años. El aumento de incidencia en los países pocos desarrollados tiene su origen muy probablemente en el cambio de estilo de vida que se está produciendo en los mismos.

Las tasas de supervivencia del cáncer de mama varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o incluso tasas superiores en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos (Coleman y cols., 2008).

Se estima que en 2012 murieron 522.000 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría de las defunciones (69%) por esa causa se registran en los países en vías de desarrollo (OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2004). Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento.

En nuestro país las tasas de mortalidad descienden, debido sobre todo a un mejor resultado de los tratamientos y a la detección precoz de esta neoplasia. Sin embargo, a nivel mundial, la prevalencia y mortalidad del cáncer de mama irá en aumento en los próximos años, ya que según las previsiones de la OMS, para 2025 habrá hasta 2,5 millones de casos nuevos y hasta 800.000 muertes debido a esta enfermedad.

1.2.2. Factores de riesgo

Se conocen bien varios factores de riesgo del cáncer de mama. Sin embargo, no es posible identificar factores de riesgo específicos en la mayoría de las mujeres afectadas (IARC, 2008; Lacey y cols., 2009). Tras el sexo, la edad es el mayor factor de riesgo conocido. Menos de un 2% de los cánceres de mama se diagnostican antes de los 35 años, teniendo su máximo entre los 45 y los 65 años, con un nuevo pico de incidencia entre los 75-79 años. Además, comparativamente, el cáncer de mama diagnosticado en una mujer joven se asocia marcadamente a una menor supervivencia global y libre de recurrencia que en una mujer de edad avanzada (Chung y cols, 1996; Maggard y cols, 2003).

Los factores reproductivos asociados a una exposición prolongada a estrógenos endógenos, tales como una menarquia precoz, una menopausia tardía y una edad madura al tiempo del primer parto, figuran entre los factores de riesgo más importantes del cáncer de mama (Brewster y Bondy, 2005). Es conocido el factor protector del embarazo como resultado de la proliferación y diferenciación del tejido mamario durante la gestación, y por lo tanto de la existencia de un número menor de células no diferenciadas que son las más vulnerables de sufrir un proceso de carcinogénesis (Cnattingius y cols., 2005). La lactancia materna tiene un efecto protector (IARC, 2008, Lacey y cols., 2009, Newcomb y cols., 1994).

Las hormonas exógenas también conllevan un mayor riesgo de cáncer de mama. Estudios de meta-análisis han demostrado un ligero aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama en las mujeres usuarias de terapia de sustitución hormonal, estimado entre un 5 a 10% extra a los cinco años aproximadamente (Collaborative Group on Hormonal Factors in breast cancer, 1997; Ross y cols., 2000; Steinberg y cols., 1991), pudiendo llegar incluso hasta un 30% en el caso de que a los estrógenos se le sumen progestágenos (Magnusson y cols., 1999).

El impacto del uso de anticonceptivos orales ha sido objeto de controversia durante décadas anteriores. Un estudio reciente y el más grande en su tipo (CARE Study), ha demostrado que no existe ningún tipo de riesgo significativo con el uso de anticonceptivos orales (Marchbanks y cols., 2002).

Danaei y cols. (2005) han calculado la contribución de diversos factores de riesgo modificables, exceptuando los factores reproductivos, a la carga global de cáncer de mama. Los autores concluyen que el 21% de todas las muertes por cáncer de mama registradas en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol, el sobrepeso y la obesidad, y la falta de actividad física. El sobrepeso supone un riesgo elevado de cáncer de mama, en especial para mujeres postmenopáusicas. El tejido graso es la principal fuente de estrógenos que posee el cuerpo tras la menopausia, cuando los ovarios dejan de producir la hormona. Una mayor cantidad de tejido graso implica un mayor nivel de estrógenos, lo que puede aumentar el riesgo de cáncer de mama. Además, las mujeres que tienen sobrepeso tienden a presentar niveles de insulina en

la sangre más elevados. Los niveles de insulina más elevados también están asociados a algunos tipos de cánceres, incluyendo el cáncer de mama (Gunter y cols., 2009).

Además de los factores ambientales, se estima que tener antecedentes familiares de cáncer de mama multiplican el riesgo por dos o tres veces. Existen toda una serie de variantes genéticas asociadas al riesgo de padecer cáncer de mama, que pueden clasificarse como mutaciones de alta penetrancia, de penetrancia moderada y como polimorfismos de baja penetrancia. Mutaciones en la línea germinal de alta penetrancia en los genes supresores de tumores *BRCA1* (localizado en el cromosoma 17q21) (Hall y cols., 1990) y *BRCA2* (localizado en el cromosoma 13q12-13 (Wooster y cols., 1994), se asocian a un riesgo muy elevado de cáncer de mama. Para mutaciones del gen *BRCA1* la frecuencia de cáncer de mama fue de 87% (Ford y cols., 1995) y para las portadoras del gen *BRCA2* fue de 84% (Ford y cols., 1998). Sin embargo, esas mutaciones son raras y explican sólo una pequeña parte de la carga total de cáncer mamario (entre un 5% y un 10%). La frecuencia de estas mutaciones en la población general es de menos del 1% (Newman y cols., 1998; Whittemore y cols., 1997).

I.3. El epitelio de la glándula mamaria humana

La glándula mamaria es un órgano en continuo desarrollo desde el estado embriogénico, pasando por la pubertad, los ciclos menstruales y los embarazos, hasta su atrofia después de la menopausia. La glándula mamaria se desarrolla durante la pubertad, debido a la producción de estrógenos por los ovarios que causan crecimiento y maduración celular (Elston y Ellis, 1998; Osborne, 1996). En ese momento, las mamas se agrandan debido al depósito de tejido graso y conectivo alrededor del parénquima en desarrollo (Osborne, 1996). Tras el desarrollo durante la pubertad, la estructura de la glándula mamaria fluctúa entre ciclos menstruales debido a los cambios hormonales a que es sometida. Durante el embarazo, la glándula mamaria se convierte en un órgano lactante diferenciado, también debido a regulación hormonal (Dickson, 1996; Osborne, 1996).

La glándula mamaria humana está formada por el pezón, la areola, y el árbol ductal que contiene de 15 a 25 ductos contruidos de forma radial a partir de capas de células glandulares secretoras y capas de células mioepiteliales (Elston y Ellis, 1998; Parmar y Cunha, 2004). Los ductos forman el árbol ductal ramificándose en lóbulos (Osborne, 1996; Parmar y Cunha, 2004). Cada sistema ductal drena a través de una vía excretora independiente o seno lactífero. Las sucesivas ramificaciones de los ductos o conductos galactóforos en dirección distal terminan en los conductos terminales. Cada conducto terminal y sus conductillos constituyen la unidad lobulillar ductal terminal (1-4 mm), que es la unidad básica funcional e histopatológica de la mama.

La unidad lobulillar ductal terminal está formada por un segmento de ducto terminal y un conjunto de ductulos, que son las unidades secretoras efectivas. El cáncer de mama se origina anatómicamente en la unidad terminal ducto-lobulillar de la glándula mamaria. Los ductos y lóbulos están revestidos por una capa interna de células epiteliales glandulares lumbinales (cúbicas a columnares) y una capa externa de células basales mioepiteliales. Dichas capas de células están separadas del estroma por la membrana basal (Jolicoeur, 2005). Una tercera capa de células presente en el epitelio de la glándula mamaria está formada por las células madre de ambas capas de células basal y luminal.

Las células basales o mioepiteliales se sitúan entre la capa de células lumbinales y la membrana basal y su función es la de mantenimiento estructural, remodelaje de la matriz extracelular, eyección de leche bajo el efecto de la oxitocina, y el control fisiológico de la célula luminal (Osborne, 1996; Jolicoeur, 2005). Las células mioepiteliales forman una capa continua de células bajo la membrana basal y se conexionan con ésta mediante miofibrillas y hemidesmosomas (Osborne 1996, Deugnier y cols., 2002). Las células mioepiteliales poseen una baja actividad proliferativa en la glándula mamaria adulta, mientras que las células lumbinales incrementan su número durante los ciclos menstruales y el embarazo (Joshi y cols., 1986; Suzuki y cols., 2000). El patrón de expresión de citoqueratinas de las células mioepiteliales difiere del de las células secretoras lumbinales.

I.4. Expresión de citoqueratinas en la glándula mamaria normal

Las citoqueratinas (CKs) son filamentos intermedios de 7-11 nm que pertenecen a una compleja y gran familia de proteínas y se expresan en las células epiteliales (Moll y cols., 1982). Su función principal es la de proteger a las células epiteliales del estrés mecánico (Lee y Coulombe, 2009). Asimismo, se ha descrito su intervención en la regulación de la síntesis proteica y parecen ser esenciales en el crecimiento celular (Kim y cols., 2006).

Las citoqueratinas se dividen en ácidas (tipo I) y básicas (tipo II), las cuales difieren en su punto isoeléctrico y peso molecular. Las citoqueratinas de tipo I incluyen las citoqueratinas 9 a 20, mientras que las citoqueratinas de tipo II incluyen las citoqueratinas 1 a 8. Los filamentos de citoqueratina son heteropolímeros obligados que requieren la presencia simultánea de polipéptido de tipo I y tipo II, los cuales están siempre en número equivalente formando dímeros y tetrameros (Franke y cols., 1983; Stewart, 1993).

La composición de subunidades de las citoqueratinas es extremadamente heterogénea, variando en función de su localización anatómica, del crecimiento celular, del ambiente, del estado de diferenciación y del momento de desarrollo embrionario. La expresión de las citoqueratinas en numerosos epitelios es diferente cuando se comparan tejidos normales con tejidos tumorales, lo que resulta en un criterio diagnóstico muy efectivo cuando se emplean los anticuerpos adecuados (Painter y cols., 2010).

Las células mioepiteliales basales y las glandulares lumbinales de la glándula mamaria normal se distinguen en las secciones de tejido en base a sus patrones de expresión de citoqueratinas. Las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 se expresan en el epitelio luminal, mientras que las células mioepiteliales basales tienen un patrón diferente, negativo para el luminal pero positivo para las citoqueratinas basales 5, 6, 14 y 17 (Moll y cols., 1982).

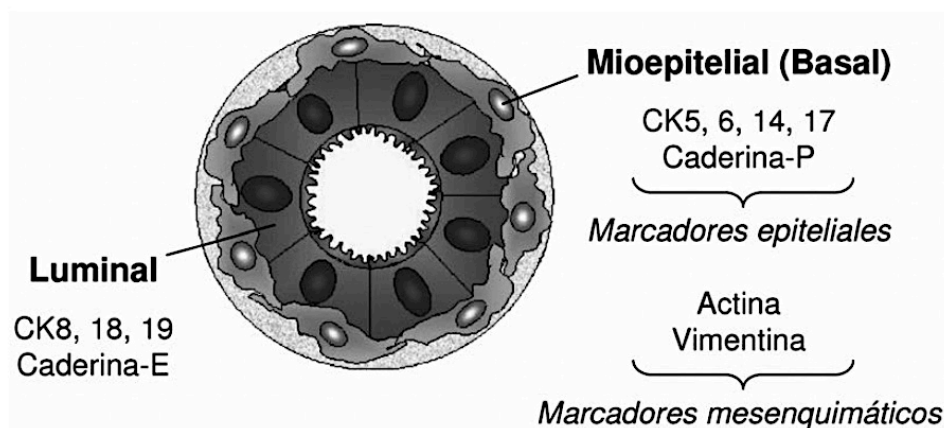


Figura 4. Tipos celulares y marcadores en la glándula mamaria (extraída de Imigo y cols., *Cuad. Cir.* 2011)

El patrón de citoqueratinas varía entre las unidades estructurales de la glándula mamaria normal (unidades ducto-lobulillares terminales [UDLT] y ductos) y la distribución de una citoqueratina particular no se restringe siempre a las células glandulares luminales o a las células mioepiteliales basales (Taylor-Papadimitriou y cols., 1989).

I.5. Clasificación histopatológica del cáncer de mama

TIPOS DE CÁNCER	PORCENTAJE
CARCINOMA <i>IN SITU</i>	
Carcinoma Ductal <i>in situ</i>	75
Carcinoma Lobular <i>in situ</i>	25
CARCINOMA <i>INVASIVO</i>	
Ductal	Más común
Lobular	
Tubular/cribiforme	
Mucinoso/coloide	
Medular	
Papilar	
Metaplásico	Menos común

Tabla 1. Tipos histológicos del cáncer de mama (extraída de Dixon y cols., 1985)

La gran mayoría de los tumores de mama son adenocarcinomas y se originan en el parénquima mamario. Los carcinomas de mama son heterogéneos en cuanto a su morfología y los diferentes tipos histopatológicos presentan un pronóstico y unas

características clínicas particulares (**Tabla 1**). Actualmente la OMS reconoce al menos 30 tipos histológicos de tumores mamarios.

Según su origen, los tumores de mama se clasifican en dos grupos mayoritarios: los que comienzan a formarse en los conductos galactóforos que transportan la leche hasta el pezón (carcinomas ductales) y los que se forman en los lóbulos mamarios que secretan la leche a los conductos (carcinomas lobulares). El cáncer de mama puede presentarse en forma invasiva, con capacidad de invadir tejidos adyacentes y con gran tendencia a metastatizar, o no invasivo, denominándose a este tipo carcinoma *in situ* o carcinoma intraductal, el cual no ha traspasado la membrana basal, sin invasión o infiltración del tejido estromal que lo rodea (**Fig. 5**).

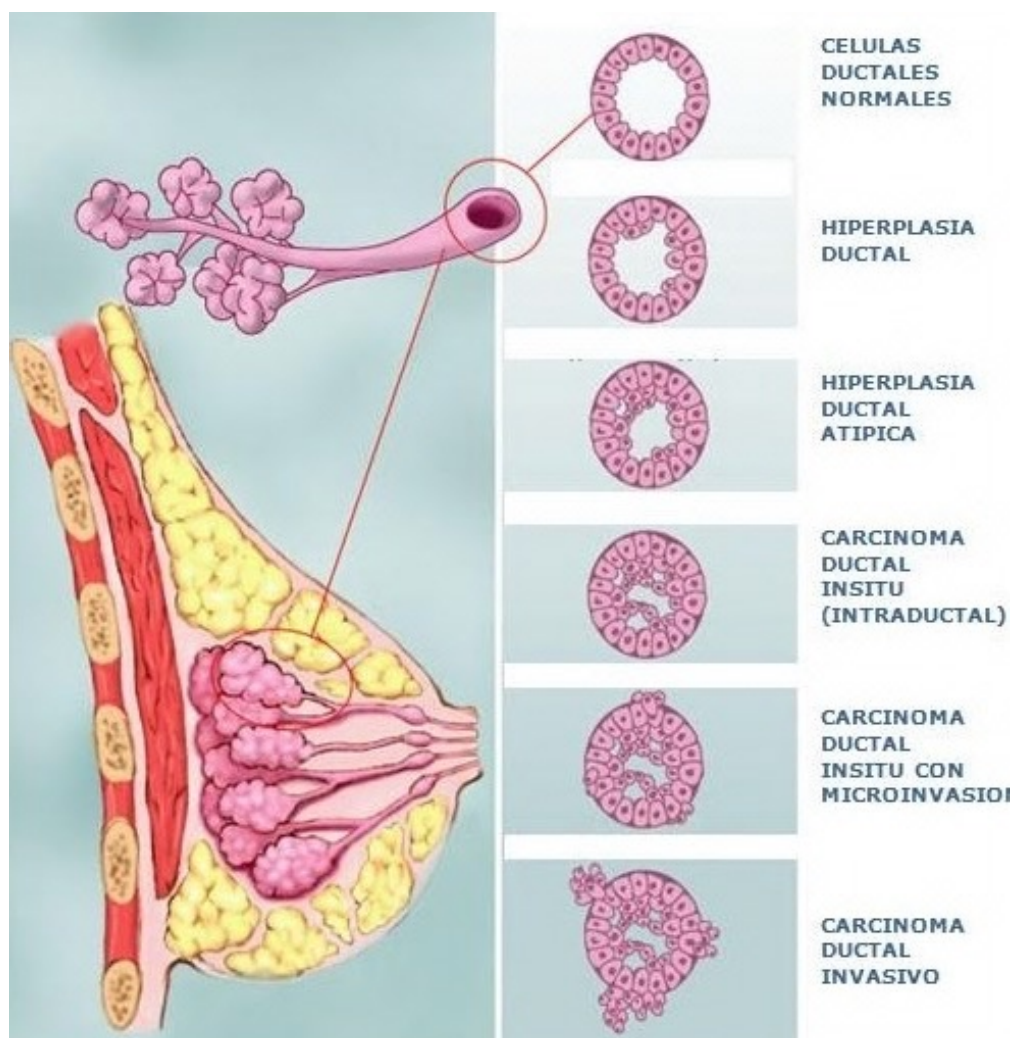


Figura 5. Secuencia de eventos en el desarrollo del cáncer de mama

La incidencia del carcinoma ductal *in situ* ha aumentado en los últimos años. Con frecuencia este tipo de tumor es multifocal o multicéntrico (es decir, presenta varias lesiones en la misma mama) y bilateral (es decir, existe afectación de ambas mamas). A diferencia del carcinoma ductal *in situ*, el carcinoma lobulillar *in situ* no parece convertirse en cáncer invasivo si no se trata. En la actualidad se desconoce qué tumores *in situ* y qué porcentaje pasan a ser tumores invasivos. El tiempo en que esto ocurre puede ser tan largo como 6 a 10 años.

El carcinoma ductal infiltrante es el más frecuente, representando el 80% de los cánceres infiltrantes de mama, mientras que la incidencia del carcinoma lobulillar infiltrante es mucho menor (alrededor del 10%). Otros tipos de cáncer de mama menos frecuentes son entre otros el tubular, el coloide o mucinoso y el medular. En el carcinoma inflamatorio de mama, las células tumorales infiltran los vasos linfáticos y la piel. La mama está globalmente enrojecida y caliente, como si estuviese inflamada, porque las células tumorales bloquean los vasos linfáticos de la piel. La incidencia de este tipo de cáncer de mama es baja, entre el 1 y el 3%. La enfermedad de Paget es una afectación de la piel del pezón y/o de la areola, asociado o no a un carcinoma subyacente intraductal ("*in situ*") o invasivo.

La clasificación histopatológica de los tumores de mama, además de las características de localización y origen, tiene en cuenta otros parámetros como el tamaño del tumor, el subtipo histológico, la gradación tumoral, la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y la invasión linfovascular. El sistema de clasificación más utilizado, el sistema TNM (tamaño del tumor, nódulos, metástasis) integra estas variables en estadios tumorales, los cuales poseen valor pronóstico de la enfermedad.

I.6. Clasificación molecular del cáncer de mama

Gracias al desarrollo durante las últimas décadas de métodos de análisis masivos, ha sido posible describir una gran variedad de biomarcadores con fines pronósticos y predictivos (Weigel y Dowsett, 2010). A pesar del elevado número de biomarcadores caracterizados, solamente unos pocos han llegado a introducirse en la rutina clínica. De acuerdo al Sistema de Graduación de Utilidad de los Marcadores de la Asociación

Americana de Oncología Médica tan solo tres biomarcadores han sido establecidos para su evaluación rutinaria en cáncer de mama: El receptor de estrógenos, el receptor de progestágenos y HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2) (Harris y cols, 2007a).

La clasificación histológica del cáncer de mama no refleja la heterogeneidad de los tumores en su comportamiento biológico ni permite identificar las respuestas a los distintos tratamientos. El análisis de los perfiles de expresión génica podría constituir un mejor método para clasificar el cáncer de mama. La técnica de "micromatrices" de ADNc ha permitido obtener un "retrato molecular" de cada tumor y un agrupamiento de los mismos en unas pocas categorías en base a sus perfiles de expresión génica (Perou y cols., 2000; Quackenbush, 2006; van 't Veer y cols., 2002). Mediante el empleo de micromatrices de ADN, el grupo de Perou (Perou y cols., 1999, 2000) estudió los perfiles de expresión génica de las células epiteliales de la glándula mamaria normal y de 40 tumores de mama (**Fig. 6**).

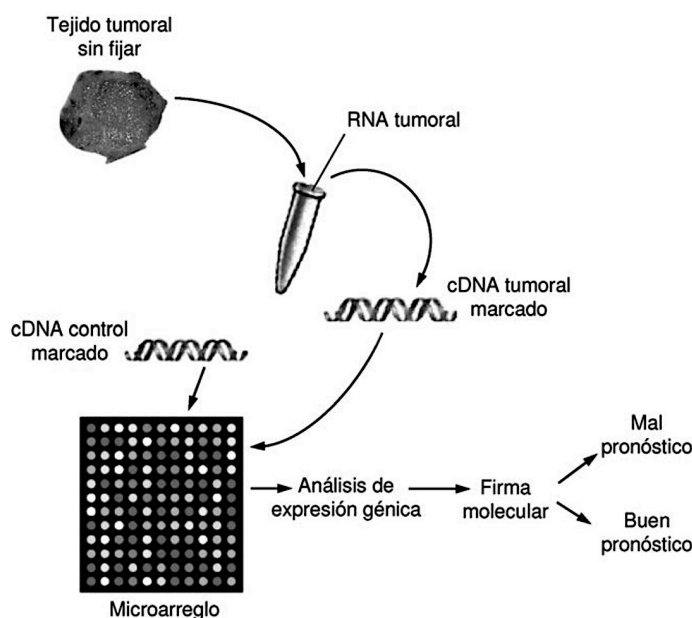


Figura 6. Método de obtención de las firmas moleculares (extraído de Imigo y cols. *Cuad. Cir.* 2011). Los "microarrays" o matrices de ADN utilizan sondas (moléculas de ADNc) complementarias de los genes de interés, se amplifican por PCR, se purifican y se fijan en un portaobjetos con la ayuda de un robot. Posteriormente el ARN extraído de las muestras de estudio (indicativo de expresión génica) se convierte en ADNc fluorescente mediante una reacción catalizada por la enzima transcriptasa inversa en

presencia de fluoróforos específicos. Las dianas fluorescentes se hibridan posteriormente con las sondas de la matriz y los híbridos creados de esta forma son retenidos en la matriz y producen una emisión característica al ser excitados por un rayo láser. Finalmente, un programa informático normaliza e integra los resultados en una imagen coloreada en función de los niveles de expresión de los distintos genes (Eisen y Brown, 1999).

Esta aproximación condujo a la primera clasificación molecular del cáncer de mama basada en un método de agrupación jerárquica de los genes. Se distinguieron 5 subtipos del cáncer de mama en función del perfil de expresión génica: Luminal A, Luminal B, Basal, HER2 y tipo “normal” (Perou y cols., 2000; Sorlie y cols., 2001; **Fig. 7**). La evolución clínica de cada uno de los subtipos, medida como supervivencia libre de enfermedad, fue significativamente peor para los subtipos basal y HER2, mejor para el luminal A, e intermedia para el subtipo luminal B (Sorlie y cols., 2003; Sotiriou y cols., 2003). van't Veer y cols. (2002) relacionaron también el perfil genético del cáncer de mama y su comportamiento clínico. Su análisis de perfiles de expresión génica en tumores de mama sin afectación ganglionar al diagnóstico demostró la existencia de grupos de pacientes que parecían beneficiarse del tratamiento de quimioterapia y no del de hormonoterapia en base al riesgo de recurrencia a distancia. El grupo de van't Veer fue capaz de establecer asimismo una firma genética capaz de identificar tumores portadores de la mutación *BRCA1*, los cuales presentaban un patrón de expresión génica similar al subtipo “basal-like” originalmente descrito por Perou y cols. (2000).

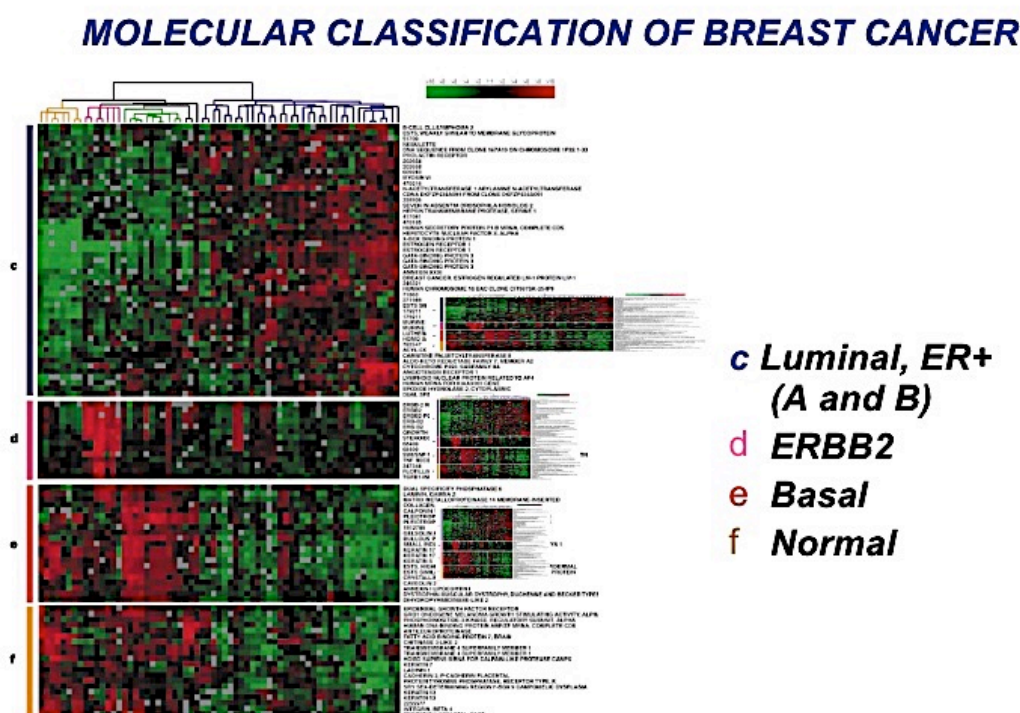


Figura 7. Agrupación jerárquica de genes según la expresión de genes intrínsecos en la micromatriz de cDNA. c) cluster de genes Luminal epitelial/ER. d) cluster de genes que sobreexpresa ERBB2. e) Cluster asociado a células epiteliales basales que contiene citoqueratinas 5 y 17. f) Un segundo cluster basal epitelial (extraída de Perou y cols. [2000]).

La existencia de diferentes patrones de expresión génica entre tumores de similar origen anatómico hace suponer que cada uno representa una entidad biológica diferente. Una hipótesis para explicar la existencia de estos patrones diferentes es el origen de cada uno de ellos a partir de diferentes tipos celulares (Sorlie y cols., 2003).

I.6.1. Subtipos moleculares del cáncer de mama

SUBTIPO MOLECULAR	PERFIL DE BIOMARCADORES
LUMINAL A	RE+ y/o RP+, HER2- y Ki67 bajo (<14%)
LUMINAL B	RE+ y/p RP+ y HER2+ (grupo luminal-HER2) RE+ y/o RE+, HER2- y Ki67 elevado (>14%)
HER2	RE-, PR- y HER2+
Basal-like	RE-, RP-, HER2- y CK5/6 y/o EGFR+

Tabla 2. Subtipos de cáncer de mama determinados por perfiles de expresión génica e inmunofenotipado empleando seis biomarcadores (extraída de Schnitt, 2010).

Los subtipos moleculares del cáncer de mama han mostrado diferencias en cuanto a incidencia y prevalencia (Carey y cols., 2006; Millikan y cols., 2008), supervivencia (Cheang y cols., 2009; Perou y cols., 2000; Sorlie y cols., 2001) y respuesta al tratamiento (Hugh y cols., 2009; Nielsen y cols., 2010; Prat y cols., 2010). La información que aportan estos subtipos “intrínsecos” complementa y amplía la aportada por los marcadores clínico-patológicos (Parker y cols., 2009).

I.6.1.1. Subtipo Luminal. Los tumores luminales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria (**Tabla 2**). Expresan el gen del receptor de estrógenos y genes asociados a su activación (*LIV1* y *Ciclina D1*) y citoqueratinas de bajo peso molecular (*CK7*, *CK8*, *CK18*). El subtipo **Luminal A** agrupa a tumores habitualmente de bajo grado histológico, y presentan mutación de p53 en menos del 20% de los casos. Poseen baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular. Son los de mejor pronóstico. Por el contrario, el subtipo **Luminal B** presenta niveles menores de receptores de estrógeno, altos niveles de genes de proliferación y mayor grado histológico que el Luminal A. El subtipo Luminal-HER2 se caracteriza, además, por expresar citoqueratinas CK9 y CK10.

Se ha sugerido que el uso de la expresión de la proteína Ki-67 como marcador inmunohistoquímico podría distinguir entre los subtipos Luminal A y Luminal B en los tumores de mama positivos para receptores hormonales (Cheang y cols., 2009). El subtipo Luminal A se definió como RH+/HER2- y Ki-67 “bajo” (<14%), mientras que el subtipo Luminal B se definió como RH+/HER2- y Ki-67 “elevado” (>14%), o bien RH+/HER2+. Los tumores Luminal B y Luminal-HER2+ se asocian a una supervivencia libre de enfermedad menor tras un tratamiento sistémico después de la cirugía (Cheang y cols., 2009).

Ambos subtipos Luminal A y Luminal B se benefician del tratamiento endocrino, aunque el beneficio es mayor en el subtipo Luminal A. La respuesta a la quimioterapia es variable, siendo mayor en el subtipo Luminal B que en el A. El subtipo Luminal B muestra elevadas tasas de recidiva en los 5 años tras el diagnóstico y un patrón de diseminación metastásico similar a los subtipos Basal y HER2 (Smid y cols., 2008).

I.6.1.2. Subtipo HER2-enriquecido. El subtipo de cáncer de mama HER2-enriquecido se caracteriza por la expresión elevada de genes asociados al proto-oncogén *ERBB2*, y suele asociarse con alteraciones de otros genes (topoisomerasa II alfa, *GATA4*, genes de angiogénesis y de proteólisis) y factores de mal pronóstico. El subtipo HER2-enriquecido está presente en un 10 a un 15% del total de los tumores de mama y sobre-expresa genes ubicados en el cromosoma 17q, incluyendo el gen del *EGFR-2* (*ERBB2*) y la proteína ligada al receptor de factor de crecimiento 7 (*GRB7*). También sobre-expresa genes de proliferación y presenta escasos genes asociados al fenotipo luminal. *ERBB2* es un proto-oncogén que cuando está sobre-expresado se asocia con caracteres histopatológicos asociados a mal pronóstico, un alto grado histológico, baja expresión de RE y RP, además de una peor respuesta a terapia. Este subtipo corresponde a la mitad de los cánceres de mama que son clínicamente HER2/neu positivos (McCafferty y cols., 2009).

El subtipo HER2-enriquecido es particularmente resistente a la terapia hormonal debido a la ausencia de receptores hormonales. La amplificación de *ERBB2* y la sobre-

expresión de su proteína HER2/neu puede ser evaluada con precisión mediante análisis del número de copias del gen por hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) o análisis de la proteína HER2 por inmunohistoquímica (IHQ). Los nuevos protocolos definen como negativo la tinción IHQ de 0 ó 1+ y positivo 3+, requiriendo confirmación de la amplificación por FISH en los casos 2+ (Wolff y cols., 2007) (**Fig. 8**).

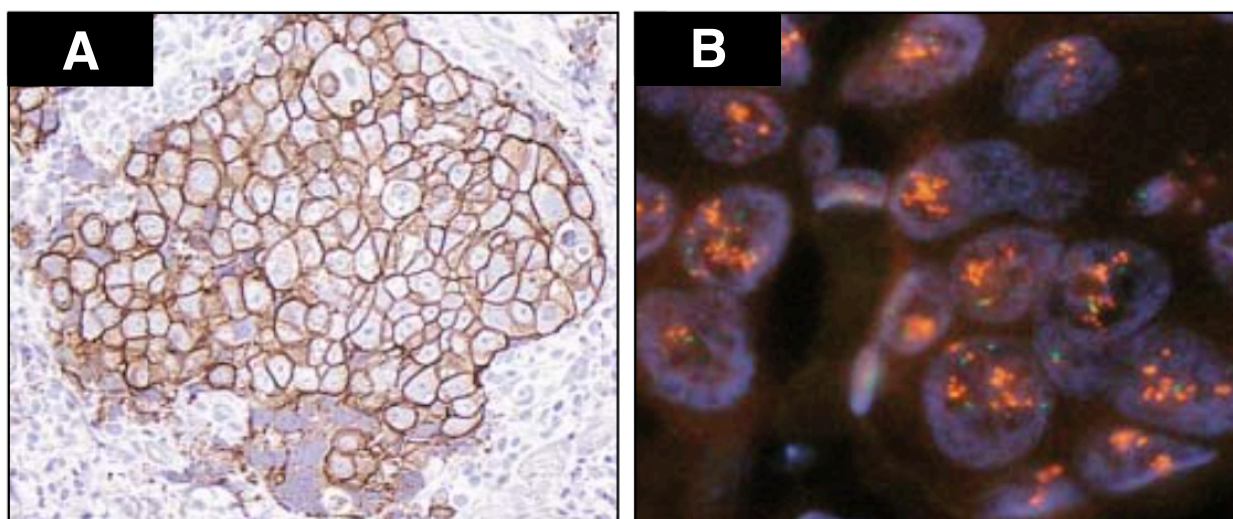


Figura 8. Análisis de HER2 en cáncer de mama. **A.** Análisis inmunohistoquímico empleando el sistema HercepTest (DAKO, Carpinteria, CA); en la microfotografía se puede observar una tinción membranosa continua 3+ de la proteína HER-2/neu (×400). **B.** Detección de la amplificación del gen HER-2/neu mediante hibridación de fluorescencia *in situ*. Las agrupaciones de señales de color rojo indican la presencia de numerosas copias adicionales del gen HER2 en comparación a las señales control en color verde correspondientes a los centrómeros del cromosoma 17 (×1,000). Extraída de Ross y cols., 2004a.

1.6.1.3. Subtipo Basal. El subtipo basal es el más agresivo de todos los tumores de mama, constituyendo de un 2 a 18% del total. Su incidencia es más alta en mujeres afroamericanas y en la premenopausia. El subtipo basal/mioepitelial fue descrito originalmente por un patrón de expresión inmunohistoquímico característico de citoqueratinas de alto peso molecular en sus células mioepiteliales. Mediante la utilización de un panel de cuatro anticuerpos (RE, HER1, HER2, y CK5/6) Nielsen y cols. (2004) demostraron que el subtipo basal-like era negativo para RE y HER2 pero positivo para citoqueratinas basales y HER1. Fue reconocido como triple negativo por ser RE negativo, RP negativo y HER2 negativo. La expresión de citoqueratinas basales se asoció con baja supervivencia (**Fig. 9**).

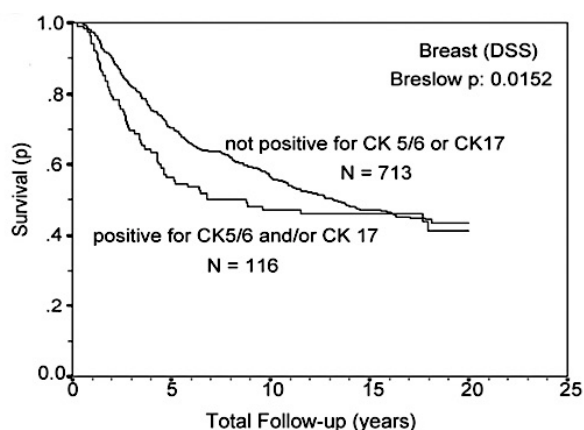


Figura 9. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier basadas en tinción IHQ de citoqueratinas basales (extraída de Nielsen y cols., 2004).

El subgrupo basal expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio mamario), factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina 1, caveolina y laminina. Los datos clínicos actuales muestran que es el subtipo más agresivo, cuya supervivencia global y libre de enfermedad es baja, debido a que las terapias endocrinas y con anticuerpos monoclonales dirigidos contra ERBB2 son ineficaces en este grupo de tumores (Soutiriu y Pusztai, 2009). Más aún, la utilidad de la quimioterapia en el manejo clínico de este subtipo de tumores es materia de discusión (Parker y cols., 2009).

En los tumores basales pueden encontrarse además alteraciones de genes reparadores del ADN. En ocasiones, el promotor del gen *BRCA1* está metilado, lo que ocasiona el silenciamiento de su expresión, también inactivación transcripcional de *BRCA1* o ambos. El 80% de las mujeres que heredan mutaciones germinales del gen *BRCA1* tienen el subtipo basal; el porcentaje de tumores basales con mutación germinal en *BRCA1* es sin embargo reducido, ya que la mayoría de los tumores basales son de tipo esporádico (Foulkes y cols., 2003).

Nielsen y cols. (2004) estudiaron dos grupos de tumores basales: 1) Fenotipo triple negativo RE, RP y HER2/neu (-) y 2) Fenotipo basal RE, RP y HER2/neu (-) EGFR (+) y/o CK 5/6 (+). Aquellos tumores que sobreexpresaron EGFR (del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) parecieron beneficiarse del uso de nuevas terapias moleculares dirigidas contra diana tales como inhibidores de la tirosina cinasa (p. ej. gefitinib, erlotinib) y anticuerpos monoclonales (p. ej. cetuximab). Los inhibidores de la

actividad tirosina cinasa del EGFR no son agentes quimioterápicos, ya que no destruyen a las células tumorales, pero sí bloquean la activación del EGFR y consecuentemente las vías de señalización intracelular activadas con la estimulación de este receptor.

I.6.1.4. Subtipo “Normal”. El subtipo tumoral “normal” del cáncer de mama compartiría características del tejido mamario normal dado que muestra una fuerte expresión de genes normalmente expresados en el tejido adiposo, una elevada expresión de genes del epitelio basal y una baja expresión de genes del epitelio luminal (Sorlie y cols., 2001). Existe el consenso de que tumores del subtipo “Normal” podrían corresponder a las muestras tumorales con una elevada contaminación de tejido normal y, por tanto, su existencia real como subtipo intrínseco no ha sido verificada.

I.6.1.5. Subtipo “bajo en claudina”. En 2007, Herschkowitz y cols. identificaron un nuevo subtipo de cáncer de mama en tumores de mama y en tumores de ratón, denominado “bajo en claudina” (del inglés “*Claudin-low*”), caracterizado por la baja expresión de genes implicados en adhesión célula-célula. En 2010, Prat y cols. identificaron este nuevo subtipo en líneas celulares de cáncer de mama. Los tumores del subtipo “bajo en claudina” se caracterizan por presentar niveles de expresión bajos o nulos de marcadores de diferenciación luminales, un alto enriquecimiento en marcadores de transición epitelio-mesénquima, activación de genes de la respuesta inmune y características semejantes a las de las células madre tumorales. Clínicamente, la mayoría de los tumores del subtipo “bajo en claudina” son carcinomas ductales invasivos RE-negativos, RP-negativos y HER2-negativos (es decir, triple negativos) de mal pronóstico, con una elevada frecuencia de diferenciación medular y metaplásica. Sin embargo, mientras los carcinomas metaplásicos se asocian con mal pronóstico y resistencia a los tratamientos (Al Sayed y cols., 2006; Hennessy y cols., 2005), los carcinomas medulares tienden a mostrar buen pronóstico a pesar de sus características patológicas agresivas (Vu-Nishino y cols., 2005).

El hecho de que algunos tumores metaplásicos y medulares compartan el perfil de expresión génica “bajo en claudina” sugiere que estos tumores pueden compartir una misma célula original o bien eventos genéticos iniciales similares, con la probable

implicación de células más “primitivas” que las iniciadoras de tumores de tipo luminal o basal (Hennesy y cols., 2009). Es muy probable que los tumores “bajos en claudina” definan específicamente un subgrupo de tumores triples negativos que poseen características moleculares semejantes a las encontradas habitualmente en las denominadas células madre tumorales mesenquimales (p. ej, el inmunofenotipo CD44⁺CD24^{-bajo}). Una de estas alteraciones oncogénicas más relevantes en el origen de los tumores de tipo “bajo en claudina” implica la vía BRCA1. Tanto los carcinomas medulares como los metaplásicos han mostrado poseer una elevada incidencia de metilación del gen *BRCA1*, hasta en un 60% de los casos (Esteller y cols., 2000; Turner y cols., 2006). Los tumores del subtipo “bajo en claudina” presentan tasas de respuesta a la quimioterapia estándar pre-operatoria intermedias a las de los tumores basales y luminales (Prat y cols., 2010).

I.6.2. Impacto de los subtipos intrínsecos en el comportamiento del cáncer de mama. El cáncer de mama es un conjunto complejo y heterogéneo de enfermedades que engloba distintas patologías, características histológicas y pronósticos clínicos (Fig. 10).

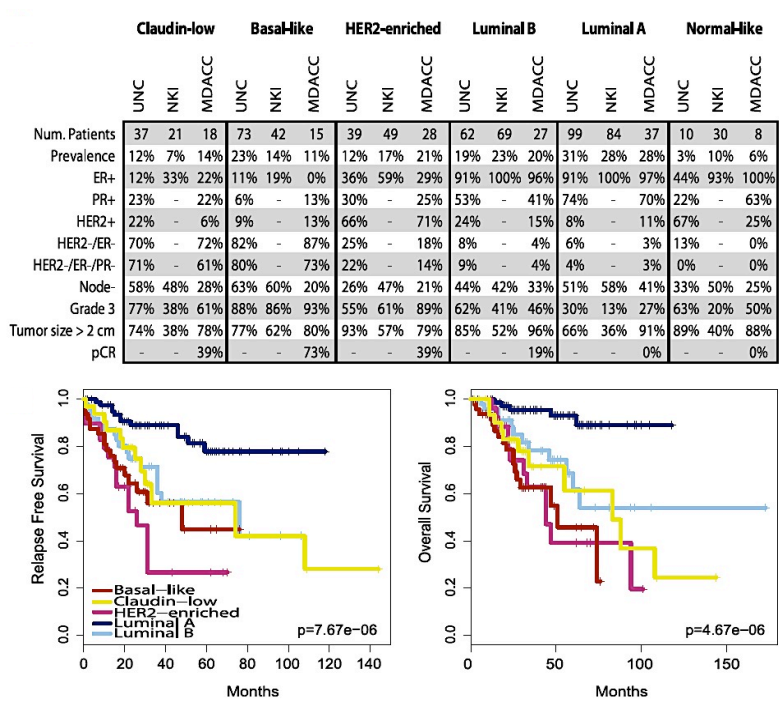


Figura 10. Características clínico-patológicas de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. (Arriba) Tabla que resume los porcentajes de diferentes variables patológicas en tres bases de datos públicas de microarrays. (Abajo) Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global (modificada de Prat y cols. 2010).

Sotiriou y Pusttai sugirieron en 2009 que el establecimiento de diferentes subtipos moleculares basados en el perfil de expresión génica ha modificado la visión del cáncer de mama, de tal forma que las diferencias moleculares subyacentes a los distintos fenotipos de cáncer de mama pueden revelar nuevas dianas terapéuticas. El valor adicional clínico de esta clasificación molecular se corresponde con el aportado por el estado de los receptores hormonales (RE y RP), del receptor del factor de crecimiento epidérmico de tipo 2 (HER2) y del grado tumoral (**Fig. 11**). En la práctica clínica, estos tres receptores son los marcadores predictivos que se emplean para la identificación de fenotipos de alto riesgo y la selección de las terapias más adecuadas (Weigelt y Reis-Filho, 2010).

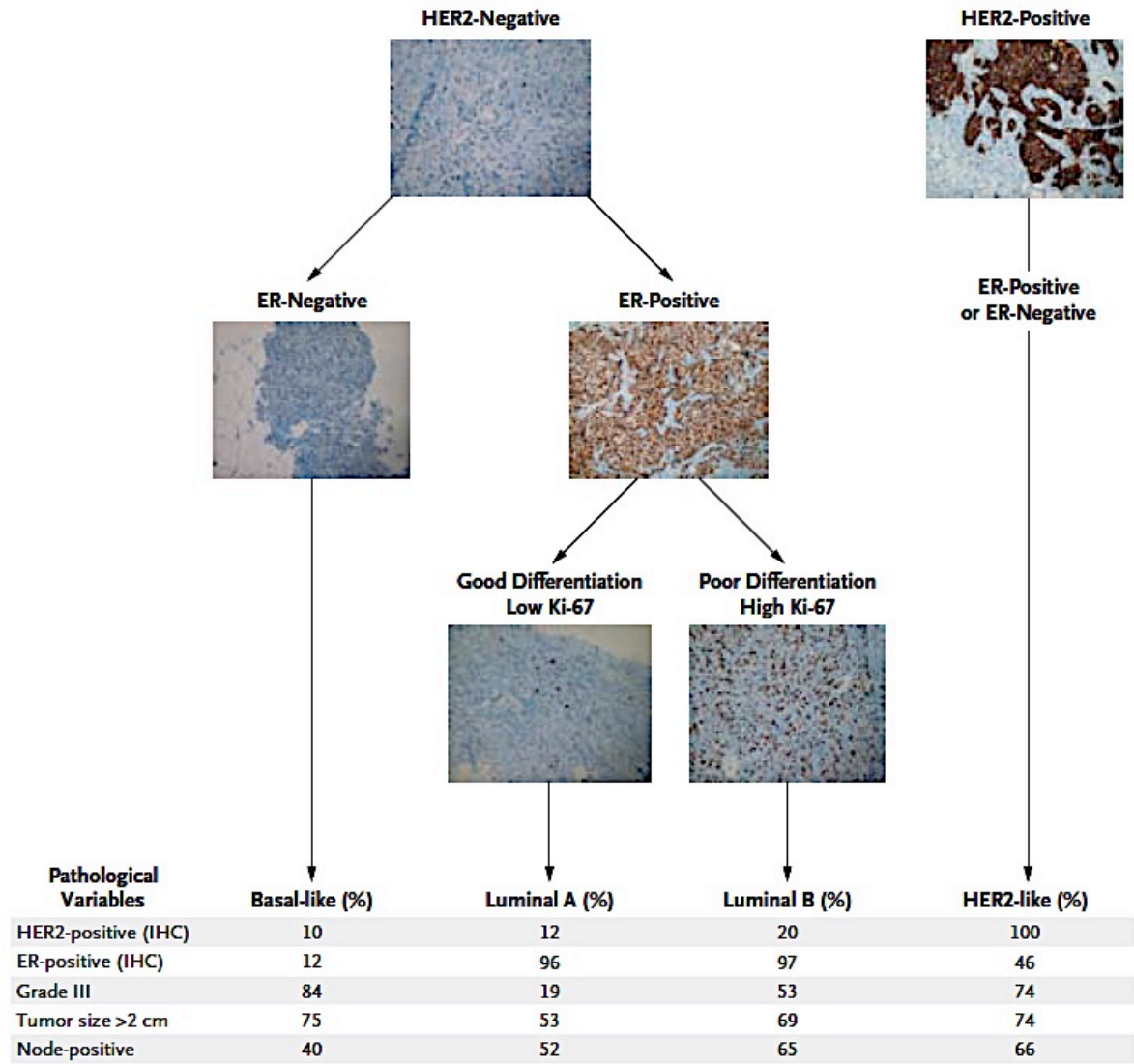


Figura 11. Correspondencia entre las características histopatológicas y la clasificación molecular del cáncer de mama (extraída de Sotiriou y Pusttai, 2009).

I.7. Cáncer de mama HER2-positivo

I.7.1. La familia HER

HER2 (del inglés *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) es un receptor de tirosina quinasa transmembrana que pertenece a la familia HER de receptores de factores de crecimiento epidérmico estructuralmente relacionada con el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Dougall y cols., 1994; Summerfield y cols., 1996). Los miembros de la familia HER son: EGFR/HER1/ErbB1, HER2/ErbB2/neu, HER3/ErbB3 y HER4/ErbB4. Todos ellos tienen un dominio extracelular que se divide en cuatro subdominios denominados I, II, III y IV. Se ha propuesto que los subdominios I y III participan en la unión al ligando mientras que los subdominios II y IV están involucrados en la dimerización de los receptores. A continuación se encuentra un dominio transmembrana y por último una región citoplasmática con un dominio intracelular con actividad tirosina quinasa (Zhang y cols., 2006).

En ausencia de ligando, los receptores HER1, HER3 y HER4 adoptan la denominada estructura “cerrada” (**Fig. 12**). En esta estructura el brazo de dimerización del subdominio II se encuentra escondido mediante interacción con el subdominio IV. Después de la unión a ligando de los subdominios I y III, el receptor adopta la denominada estructura “abierta”, donde el brazo de dimerización queda expuesto y promueve la homo- y heterodimerización receptor-receptor (**Fig. 12**). HER2 tiene una estructura “abierta” fija donde el brazo de dimerización del subdominio II está permanentemente expuesto y el subdominio II y III interaccionan haciendo imposible su unión a ligando (Klapper y cols., 1999).

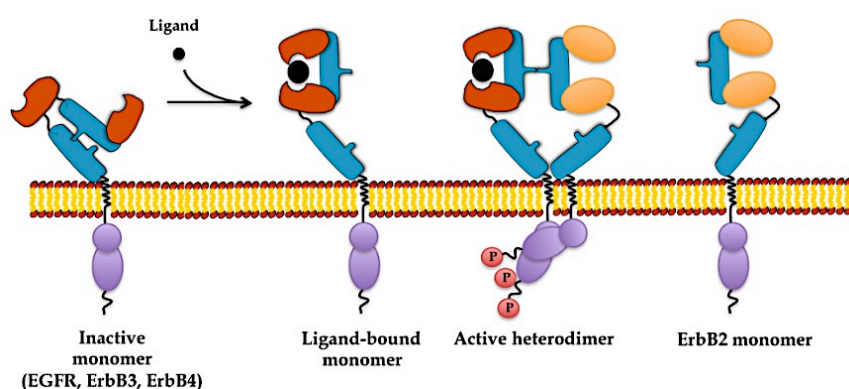


Figura 12. Dimerización y activación de los receptores de la familia HER. (Adaptado de Wieduwilt y Moasser, 2008).

La dimerización de los receptores HER da lugar a la formación de un dímero asimétrico entre los dominios quinasa de los receptores. En este dímero el lóbulo C de un receptor interacciona con el lóbulo N del segundo receptor (Zhang y cols., 2006), activando su dominio quinasa. Esto provoca la fosforilación en los residuos tirosina presentes en la cola carboxi-terminal del receptor que servirán como sitios de anclaje para diferentes proteínas efectoras, las cuales inician vías de transducción de señal intracelulares (Olayioye y cols, 2000; Schlessinger, 2004). Este mecanismo explica por qué HER3, que tiene sustituciones en residuos esenciales del lóbulo N, no puede ser activado, pero puede activar a otro receptor de la familia HER presente en un heterodímero (Zhang y cols., 2006). La activación del dominio citoplásmico es el inicio de una vía de propagación muy compleja que transmite la señal recibida por el receptor en la membrana celular hasta el núcleo, donde finalmente se integra e inicia la respuesta biológica que resulta en proliferación celular, diferenciación, supervivencia y angiogénesis.

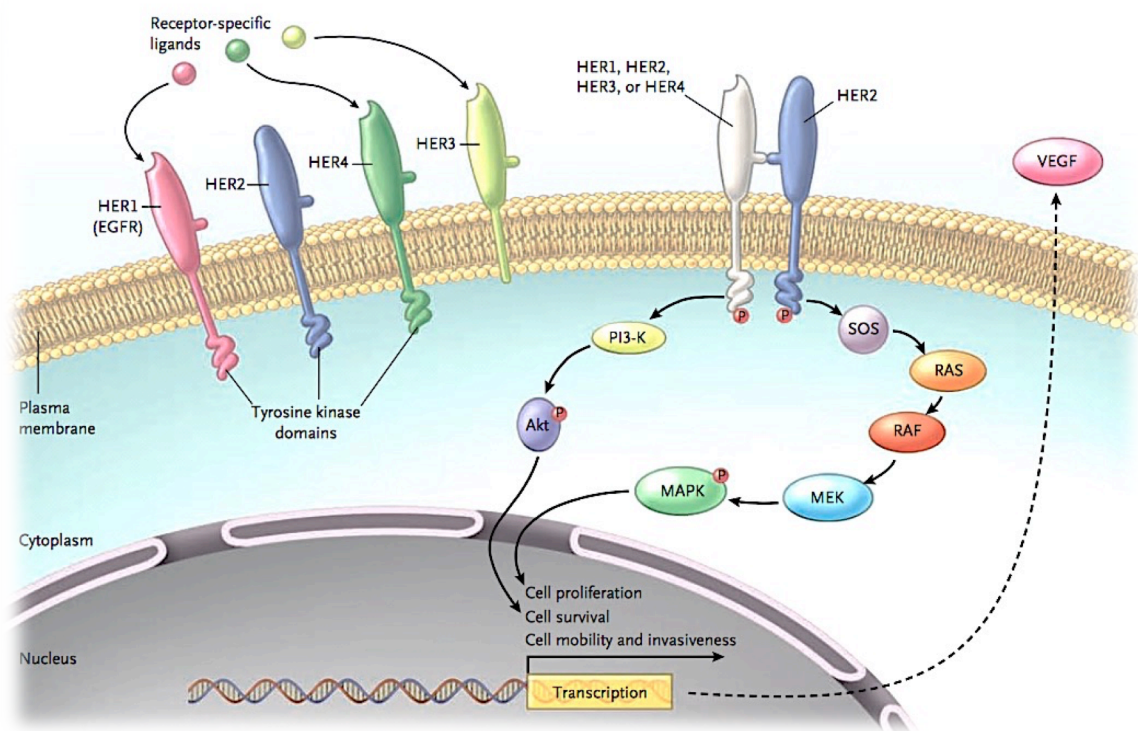


Figura 13. Transducción de señales por la familia de receptores HER. Los cuatro miembros de la familia de receptores HER son HER1, HER2, HER3 y HER4. Existen ligandos específicos para los receptores HER1, HER3, y HER4. Los receptores HER1, HER2 y HER4 poseen dominios intracelulares tirosina quinasa. La fosforilación del dominio tirosina quinasa debido a fenómenos de homodimerización o heterodimerización induce señales de proliferación y supervivencia celular. El receptor HER2 es el socio de dimerización preferido por el resto de

miembros de la familia HER. Los residuos de tirosina fosforilados (activados) en el dominio intracelular de HER2 activan a PI3-K, la cual a su vez se une y fosforila (activa) al enzima AKT, encargada de regular la supervivencia celular. En paralelo, la proteína SOS (un factor de intercambio de nucleótidos de guanina), activa al enzima RAS que, a su vez, activa a la cascada de señalización RAS/RAF/MEK. La quinasa MEK fosforila, entre otros, a MAPK, encargada de la proliferación celular. Uno de los múltiples efectos de la activación de estas cascadas de señalización por parte de la familia de receptores HER es la producción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), clave en el proceso de angiogénesis (extraída de Hudis, 2007).

La identidad de las proteínas efectoras que se acoplan al receptor depende de la secuencia de aminoácidos que flanquea los residuos tirosina fosforilados del receptor y, por tanto, cada receptor reclutará unas proteínas diferentes que desencadenarán una respuesta determinada. Las principales vías de transducción de señal activadas por los receptores HER son la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que regula principalmente la proliferación celular (Lewis y cols., 1998), la vía del fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI-3K)/AKT, importante para la supervivencia celular (Olayioye y cols., 2000; Vivanco y cols., 2002; Wieduwilt y Moasser, 2008) y el transductor de señal y activador de proteínas de transcripción STATs (Yarden y Sliwkowski, 2001; Yu y Jove, 2004) (**Fig. 13**).

Cada factor de crecimiento tiene preferencia por formar un dímero determinado, pero no todos tienen importancia biológica. Un ejemplo sería el dímero formado por dos receptores HER3, ya que éste no tiene actividad quinasa y no puede generar señal. A la hora de formar heterodímeros, un determinado receptor HER selecciona la pareja preferida de los tres receptores restantes una vez que éstos se han unido a su ligando. Los heterodímeros que contienen HER2 son extremadamente activos, siendo el heterodímero HER2-HER3 el que genera una señal mitogénica más potente. Esto es debido a que es el que tiene la tasa de disociación más baja y puede estar activado más tiempo que el resto.

Una activación insuficiente de la vía HER puede desencadenar enfermedades neurodegenerativas, mientras que una sobreactivación puede generar distintos tipos de cáncer. En un tumor, las células han de crecer y dividirse constantemente, alterar su metabolismo, evitar los mecanismos de muerte celular, mejorar la aportación de nutrientes creando nuevos vasos sanguíneos, y finalmente, han de poder marchar del

tumor primario, viajar por los vasos sanguíneos y linfáticos y establecerse en un nuevo tejido. La vía HER está implicada en todos y cada uno de estos pasos, lo que explica la alteración habitual de esta vía en las células tumorales (Holbro y cols., 2003). La sobre-expresión de la vía HER es muy frecuente en distintos tipos de tumores y normalmente se asocia con una fase avanzada del cáncer y un mal pronóstico (Salomon y cols., 1995).

Los principales mecanismos a través de los cuales las células tumorales sobreactivan la vía HER, especialmente en el caso de los receptores HER1 y HER2, son la sobreproducción de factores de crecimiento y/o de sus receptores por estimulación autocrina, endocrina o paracrina (Michael y cols., 1980), la activación constitutiva de los receptores causada por mutaciones (Di Fiore y cols., 1987), y la inhibición de los procesos de retroalimentación negativa (Witsch y cols., 2010; Yarden y Sliwkowski, 2001).

1.7.2. Papel del oncogén HER2 en el cáncer de mama

La proteína HER2 es un receptor de membrana de 185 KD descrito por primera vez hace tres décadas (Schechter y cols., 1984) y está codificada por el oncogén *ERBB2/HER2* localizado en el cromosoma 17q21 (Yamamoto y cols., 1986). Este oncogén está amplificado en un 10-30% de los cánceres de mama y se considera un marcador de mal pronóstico (Slamon y cols., 1987) dado que su sobre-expresión se asocia significativamente a un fenotipo agresivo incluyendo la resistencia a hormonoterapia y terapias citotóxicas y una baja supervivencia global (Barnes, 1993) (**Fig. 14**).

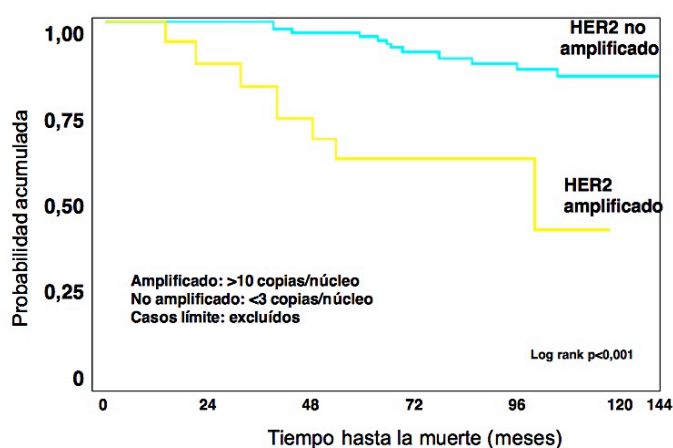


Figura 14. Supervivencia de los pacientes con cáncer de mama sin afectación ganglionar en relación con el estado de expresión del receptor HER2 (modificada de Ross y Fletcher, 1998).

La amplificación del gen que codifica la proteína HER2 es la causa del aumento en el número de receptores en el 92% de los tumores de mama que sobre-expresan HER2 (Pauletti y cols., 1996). Como consecuencia del elevado número de receptores se pueden producir homodimerizaciones espontáneas de HER2 y la consiguiente señalización a partir de estos dímeros HER2-HER2. Otra causa que genera dímeros de forma espontánea es la presencia de una mutación en el aminoácido 655, la cual provoca la activación constitutiva del receptor (Papewalis y cols., 1991). Muchos tumores con niveles elevados de HER2 presentan también una estimulación autocrina elevada de HER1 (Salomon y cols., 1995), lo cual aumenta el potencial oncogénico de estas células tumorales.

La sobre-expresión de HER2 se ha relacionado con un aumento en el número y en la proliferación de células iniciadoras en el tumor primario, lo cual podría explicar el peor pronóstico de los cánceres de mama HER2-positivos (Kakarala y Wicha, 2008; Korkaya y cols., 2008; Magnifico y cols., 2009), ya que según la hipótesis de las células madre (ver más adelante), éstas podrían ser las responsables de la progresión del tumor a pesar de una respuesta inicial a la terapia (Eyler y Rich, 2008).

I.7.3. Terapias anti-HER2: Trastuzumab (Herceptin)

Dado que una característica común de muchos tumores sólidos es la desregulación de la vía HER, no es extraño el interés en el desarrollo de intervenciones farmacológicas diseñadas contra el receptor HER. Otros motivos por los que la vía HER es atractiva para la terapia dirigida son que los niveles elevados de receptores HER se correlacionan habitualmente con un peor pronóstico, que las células tumorales tienen un número de receptores muy superior a las células no tumorales (por lo que es de esperar un menor número de efectos secundarios) y que la expresión del receptor en las células tumorales es homogénea. El primer anticuerpo monoclonal humanizado recombinante aprobado por la *Food & Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos para el tratamiento de tumores sólidos HER2-positivos fue trastuzumab (Herceptin), diseñado por Genentech y aprobado en 1998 para el tratamiento del cáncer de mama metastásico que sobre-expresa o amplifica HER2 (**Fig. 15**). El principal factor limitante del uso de trastuzumab es su cardiotoxicidad, especialmente

cuando se asocia con el uso de antraciclinas (Gonzalez-Angulo y cols., 2006).

Trastuzumab es un anticuerpo murino humanizado dirigido contra el dominio extracelular de HER2 (Carter y cols., 1992). La eficacia de trastuzumab como antitumoral ha sido validada en numerosos estudios donde este anticuerpo ha demostrado una inhibición significativa del crecimiento tumoral y sensibilización a la quimioterapia (Slamon y cols., 2001).

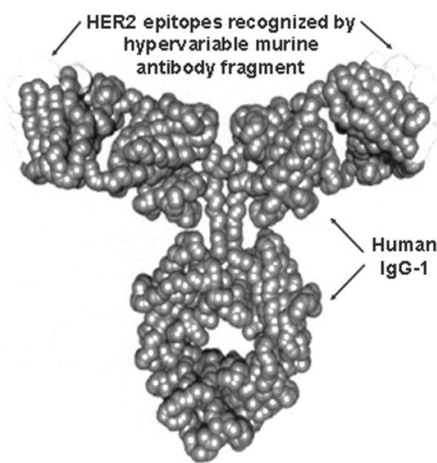


Figura 15. Trastuzumab (Herceptin). La molécula de trastuzumab incluye los epitopos de HER2 reconocidos por el fragmento hipervariable del anticuerpo murino 4D5 y la estructura clásica de un anticuerpo humano de la clase IgG1 (extraída de Ross y cols., 2004b).

Aunque el mecanismo por el que trastuzumab inhibe la señalización mediada por HER2 no es completamente conocido (**Fig. 16**), sus efectos antitumorales se atribuyen a (Nahta y Esteva, 2006; Spector y Blackwell, 2009):

- La inhibición de la interacción receptor-receptor.
- La disminución del número de receptores HER2 presentes en la membrana por endocitosis.
- La inhibición de la liberación del dominio extracelular (ECD) del receptor (Molina y cols., 2001).
- La activación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).
- La disminución de la reparación del ADN.
- La disminución de la señal de transducción de señales.
- Efectos anti-angiogénicos (Hudis, 2007; Spector y Blackwell, 2009).

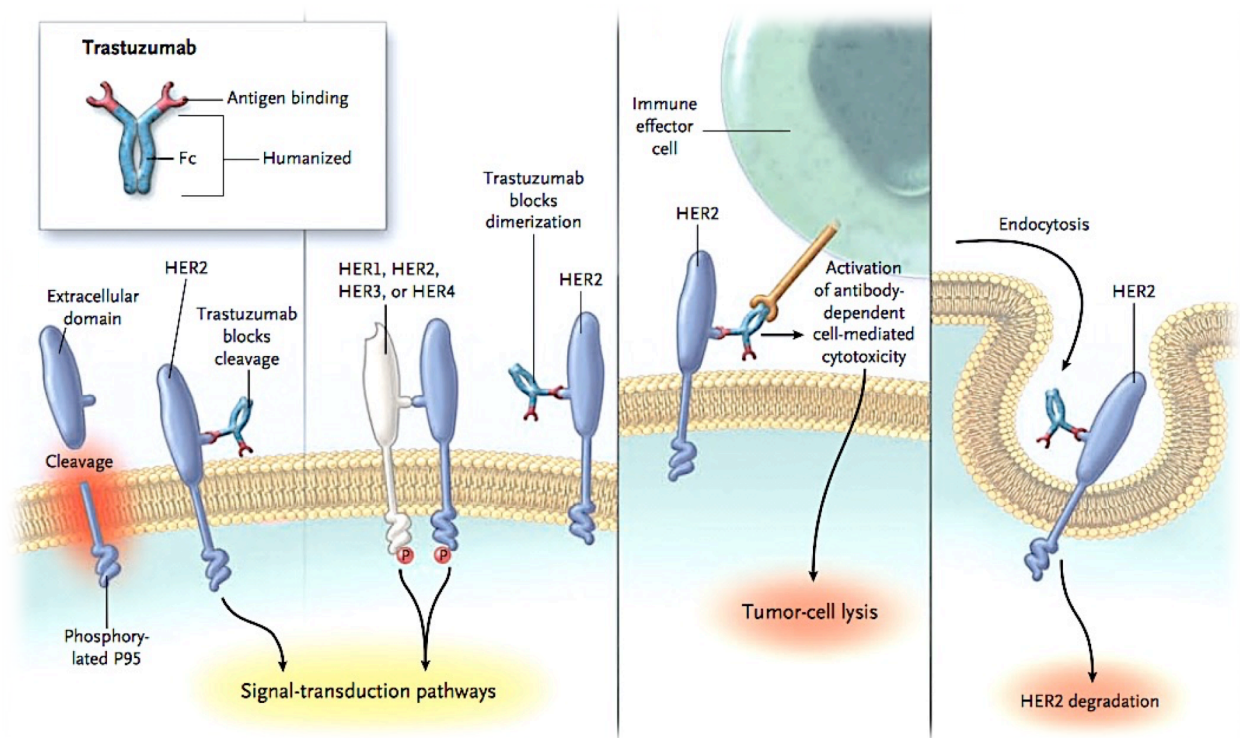


Figura 16. Mecanismos de acción de trastuzumab (Herceptin). La liberación del dominio extracelular de HER2 genera un fragmento (p95) fosforilado unido a membrana, el cual puede activar las cascadas de transducción de señales. La unión de trastuzumab al dominio yustamembrana de HER2 reduce el corte y liberación del dominio extracelular, reduciendo de esta manera la aparición del fragmento p95. Trastuzumab puede reducir la liberación del dominio extracelular de HER2 al impedir físicamente los procesos de homodimerización o heterodimerización. Trastuzumab es capaz de reclutar las células efectoras del sistema inmune y otros componentes del proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, lo que finalmente induce un proceso de muerte celular. Se han postulado otros mecanismos, incluyendo la disminución de los niveles membranales de HER2 a través de un proceso de activación de la endocitosis (extraída de Hudis, 2007).

Tras la aprobación del uso de trastuzumab en el cáncer de mama HER2 metastásico en el año 1998 (Slamon y cols., 2001), su uso como tratamiento adyuvante en la práctica clínica se implantó en el año 2006 (Piccart-Gebhart y cols., 2005). El balance riesgo-beneficio demostrado en diversos estudios clínicos en mujeres con cáncer de mama HER2-positivo temprano ha demostrado que 1 año de tratamiento adyuvante es el tiempo óptimo de intervención basada en el empleo de trastuzumab (Baselga y cols., 2006). El beneficio obtenido con el uso de trastuzumab aún después de la progresión de la enfermedad indica la necesidad de la supresión continua de la vía de señalización HER2 (Spector y Blackwell, 2009).

I.7.4. Resistencia a trastuzumab

Aunque la combinación de trastuzumab y quimioterapia prolonga la supervivencia en mujeres con cáncer de mama avanzado HER2-positivo, la mayoría de las mujeres desarrollan resistencia a trastuzumab dentro de un año del inicio de tratamiento (Slamon y cols., 2001). Asimismo, la terapia adyuvante con trastuzumab reduce el riesgo de recaída en un 50% y reduce el riesgo de muerte a una tercera parte (Piccart-Gebhart y cols., 2005). Sin embargo, aproximadamente un 15% de las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama temprano HER2 positivo, presentan resistencia primaria o *de novo* a trastuzumab y recaen a pesar de la terapia.

Se han descrito numerosos mecanismos de resistencia a trastuzumab (Bender y Nahta, 2008; Nahta y Esteva, 2006), entre los que se incluyen:

- Sobre-expresión de la mucina MUC4, la cual impide estéricamente la unión de trastuzumab al receptor HER2 (Nagy y cols., 2005).
- Presencia de p95-HER2, una forma truncada del receptor que conlleva la pérdida del dominio de unión extracelular para trastuzumab (Scaltriti y cols., 2007).
- Sobre-expresión de Rac1, una pequeña GTPasa similar a Ras, que afecta la endocitosis del receptor HER2 mediada por trastuzumab (Dokmanovic y cols., 2009).
- Compensación de la señal a través de procesos de *crosstalk* de HER2 con otros miembros de la familia HER (Huang y cols., 2010) o a través de la sobreproducción de ligandos específicos para receptores HER (EGF, heregulina, betacelulina, etc).
- La aparición de resistencia a trastuzumab no es exclusiva de la compensación de la señal a través de otros receptores de la vía HER y/o de sus ligandos. Otros receptores con actividad tirosin quinasa como el receptor tipo 1 del factor de crecimiento de la insulina (IGF-1R) pueden estar implicados. Una señalización aumentada de la vía IGF-1R interfiere con la acción de trastuzumab (Lu y cols., 2001). HER2 y EGF-1R pueden heterodimerizar de manera exclusiva en las células resistentes a trastuzumab (Nahta y cols., 2005).

- Deficiencia de PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) (Nagata y cols., 2004), aunque en discusión según estudios recientes (Nuciforo y cols., 2015; De Mattos-Arruda y cols., 2015).
- Hiper-activación de la vía PI-3K/Akt (Berns y cols., 2007).
- Disminución de los niveles de p27^{Kip1}, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (Nahta y cols., 2004, Nahta y Esteva, 2006).
- Niveles elevados circulantes del dominio extracelular de HER2, lo que podría generar fenómenos de competición por la unión a trastuzumab (Calabrich y cols., 2008).

I.7.5. Nuevas terapias moleculares en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo

Existen diferentes estrategias terapéuticas tales como nuevos anticuerpos monoclonales, inhibidores tirosina quinasa de la familia HER, terapias antiangiogénicas, inhibidores de la chaperona *heat shock protein 90* (Hsp90), inhibidores de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e inhibidores de insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) que podrían ser empleadas para evadir los mecanismos de resistencia a trastuzumab (**Fig. 17**).

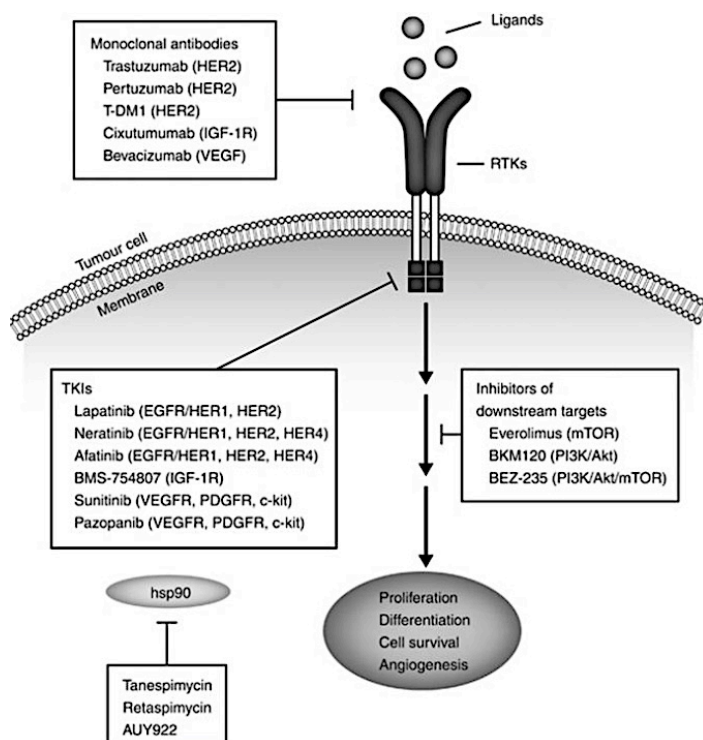


Figura 17. Terapias moleculares en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo. La figura ilustra las dianas moleculares de fármacos aprobados y en investigación para el tratamiento del cáncer de mama metastásico HER2-positivo. Abreviaturas: Akt, protein kinase B; c-kit, stem cell factor receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; HER, human epidermal growth factor receptor; hsp90, heat shock protein 90; IGF-1R, insulin-like growth factor-1 receptor; MBC, metastatic breast cancer; mTOR, mammalian target of rapamycin; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; RTK, receptor tyrosine kinase; TKI, tyrosine kinase inhibitor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor (extraída de Tsang y Finn, 2012).

Aunque trastuzumab sigue siendo el estándar de tratamiento de los pacientes con tumores HER2-positivos, una lista siempre creciente de estudios ha comenzado a poner de manifiesto que otros agentes moleculares anti-HER2 pueden proporcionar alternativas eficaces de tratamiento capaces de maximizar el beneficio de trastuzumab así como de impedir o retrasar la aparición de fenómenos de resistencia al mismo. Lapatinib es un inhibidor tirosina quinasa reversible dual HER1/HER2 que ha demostrado su eficacia tras el fallo a trastuzumab en el cáncer de mama metastásico HER2-positivo (Johnston y Leary, 2006). Neratinib es un inhibidor tirosina quinasa pan-HER (HER1/HER2/HER4) irreversible (Rabindran y cols., 2004). Afatinib es otro inhibidor pan-HER irreversible que también ha demostrado actividad en cáncer de mama HER2-positivo refractario a trastuzumab (Yamamoto y cols., 2011). Pertuzumab es un anticuerpo monoclonal que inhibe la dimerización de la familia HER, bloqueando así la activación de la cascada de señalización. Su sitio de unión al receptor es distinto al sitio de unión de trastuzumab, inhibiendo la formación de los heterodímeros de HER2 con otros miembros de la familia HER, incluyendo el heterodímero HER2/HER3 que genera la señalización más potente (Franklin y cols., 2004; **Fig. 18**).

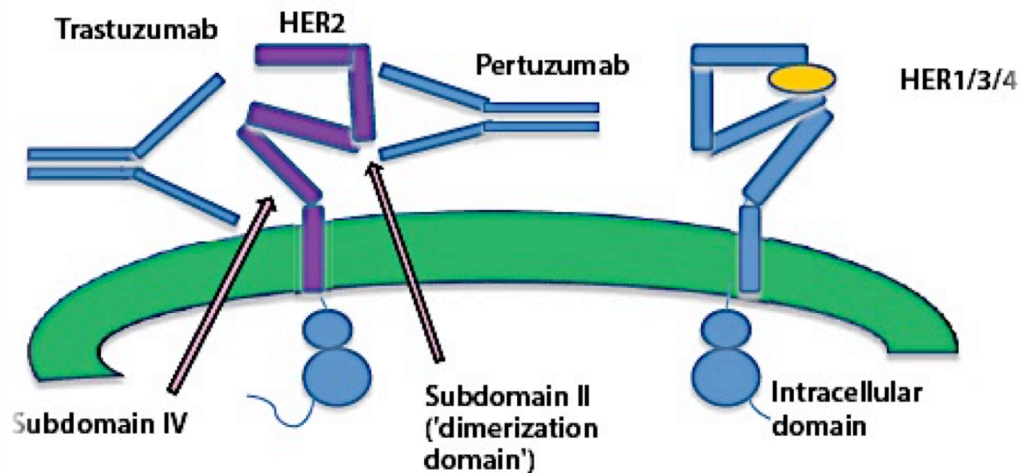


Figura 18. Sitios de unión de los anticuerpos monoclonales anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab. Los anticuerpos monoclonales anti-HER2 trastuzumab y pertuzumab son IgG1s que activan la citotoxicidad celular mediada por anticuerpo. Sin embargo, sus mecanismos de acción difieren en base a sus sitios de unión. Mientras que trastuzumab se une al subdominio IV e inhibe la activación de HER2, pertuzumab se une al subdominio II e inhibe la activación de HER2 a través de la interacción con HER1/HER3/HER4.

La combinación de ambos fármacos, pertuzumab y trastuzumab, consigue un bloqueo más eficaz de las vías de señalización HER2. El estudio CLEOPATRA demostró que la combinación de pertuzumab, trastuzumab y docetaxel comparado con placebo más trastuzumab y docetaxel prolonga significativamente la supervivencia libre de progresión cuando se usa como primera línea de tratamiento en el cáncer de mama metastásico HER2 (Baselga y cols., 2012).

Trastuzumab-DM1 (T-DM1) es un conjugado droga-anticuerpo, consistente en la unión de trastuzumab al agente citotóxico DM1 (Emtansine, una droga anti-microtubulos) (Lewis Phillips y cols., 2008). Basándose en los datos obtenidos en el estudio EMILIA (Verma y cols., 2012), la FDA de los Estados Unidos aprobó en 2013 el uso de trastuzumab emtansina (T-DM1) para la población HER2-positiva metastásica que ha sido tratada previamente con trastuzumab y un taxano.

Las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) juegan un papel importante en el mantenimiento funcional de proteínas incluyendo HER2. Tanespimycine, un inhibidor de la chaperona Hsp90 ha demostrado un aumento significativo del 26% de respuestas en combinación con trastuzumab en una cohorte de pacientes HER2-positiva que había progresado previamente al tratamiento con trastuzumab (Modi y cols., 2011).

Otra estrategia para combatir la resistencia a trastuzumab implica la modulación de la vía PI3K/AKT/mTOR (Nahta y O'Regan, 2010). En concreto, la inhibición dual de HER2 y de PI3K es necesaria para evitar los fenómenos de resistencia a trastuzumab inducidos por mutaciones en el gen *PIK3CA* (Garrett y cols., 2013), aunque esta inhibición dual también parece producir beneficio en tumores con la forma salvaje del gen *PIK3CA* (Rexer y cols., 2014)

Everolimus, un inhibidor oral de mTOR, combinado con trastuzumab y quimioterapia ha demostrado un índice de respuestas de un 46% en una población altamente pretratada (André y cols., 2008). Otros inhibidores de PI3K/AKT, como BKM120 y BEZ-235 están actualmente en fase de investigación clínica.

I.8. La hipótesis de las células madre tumorales (CMTs)

Una teoría del origen del cáncer hace referencia a la existencia de las células madre tumorales (CMTs), la cual postula que al igual que ocurre en el desarrollo de los tejidos del organismo humano adulto, el crecimiento del tumor es sostenido por una pequeña proporción de células indiferenciadas con capacidad de auto-renovación (*self-renewal*). Además estas células serían capaces de diferenciarse en los distintos tipos celulares del tumor y tendrían una mayor resistencia a los tratamientos convencionales que el resto de células tumorales, siendo por tanto las últimas responsables tanto de la heterogeneidad tumoral como de la progresión de la enfermedad.

A pesar del enorme interés que despierta actualmente, la hipótesis de las CMTs no es un concepto nuevo. Ya en el siglo XVII el médico y químico John Stahl especuló que los tumores podrían tener una subpoblación de “simientes” con capacidad para autopropagarse, las cuales serían las causantes de las recidivas al mantenerse en el cuerpo después de la cirugía. En 1967, Fialkow y cols. demostraron el origen clonal de la leucemia mieloide crónica, postulando que la enfermedad se originaba a partir de una célula madre común a eritrocitos y granulocitos. En 1994 se consiguió aislar mediante marcadores de células madre hematopoyéticas una población celular de leucemia mieloide aguda capaz de transmitir la enfermedad a ratones inmunodeficientes (Lapidot y cols., 1994). En tumores sólidos no-hematológicos, sin embargo, no es hasta la década de los años 70 del siglo pasado cuando se empiezan a realizar ensayos específicos para intentar caracterizar a las CMTs. Pierce, en 1974, al trasplantar células tumorales procedentes de teratocarcinomas de un ratón a otro, constató la existencia de una progenie de células no-tumorigénica, especulando que los tumores podrían disponer de una población reducida de *células madre malignas* con capacidad tumorigénica, capaces de generar *células hijas* con diferentes grados de diferenciación pero incapaces de iniciar la formación de tumores. Desde entonces se han identificado, mediante el uso de diferentes marcadores, poblaciones de CMTs en distintos tumores sólidos incluyendo el cáncer de mama (Al-Hajj y cols., 2003).

I.8.1. Origen de las CMTs

Las Células Madre Adultas (CMAs), que se caracterizan por su capacidad de autorrenovación y su multipotencialidad para diferenciarse en los diferentes tipos celulares que componen un tejido, originan progenitores con menor capacidad de autorrenovación y más restringidos en su potencial de diferenciación. Estos a su vez se diferencian en células cada vez más comprometidas con un determinado linaje celular hasta que llegan a la célula madura plenamente funcional en lo que se conoce como diferenciación terminal (Weissman, 2000). La hipótesis de la CMT postula una organización jerárquica del tumor similar a la observada en los tejidos, donde las CMTs poseerían una serie de características asociadas a las células madre del tejido normal (**Fig. 19**). Según esta hipótesis, las CMTs tendrían la habilidad de dar lugar a los distintos tipos celulares observados en un tumor al dividirse tanto de forma simétrica, generando células del mismo tipo, como asimétrica, originando progenitores de amplificación rápida pero transitoria. Estos precursores generarán precursores comprometidos con un linaje de células tumorales diferenciadas y sin capacidad tumorigénica, las cuales formarán grueso del tumor (Charafe-Jauffret y cols., 2008; Reya y cols., 2001).

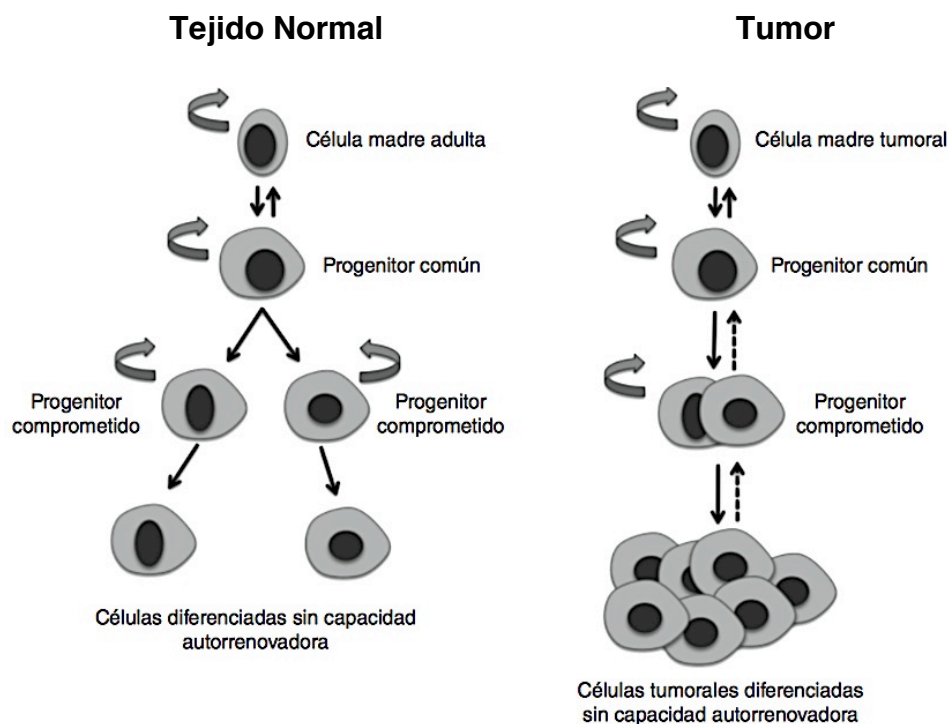


Figura 19. Analogía de la jerarquía celular de un tejido sano y de un tejido tumoral (extraída de Eguiara y cols., 2012).

Este modelo jerárquico implica que el mantenimiento del tumor está sostenido por una pequeña población de células con características de célula madre, a diferencia del modelo estocástico o tradicional del cáncer según el cual cualquier célula del tumor es capaz de mantener y expandir el tumor así como de dar lugar a nuevos tumores.

El modelo jerárquico de las CMTs ha sido respaldado por una serie de evidencias importantes. En primer lugar, no todas las células del tumor tienen las mismas capacidades para dar lugar a nuevos tumores. Se ha observado una gran variabilidad entre las células tumorales en cuanto a su capacidad de formar colonias *in vitro* y tumores *in vivo* mediante xenotrasplante en ratones inmunodeficientes (Lobo y cols., 2007). De la misma manera, según el modelo estocástico tradicional, bastaría con trasplantar un pequeño número de células para generar nuevos tumores, sin embargo se necesita trasplantar millones de células para prender un tumor en ratones inmunodeficientes (Sagar y cols., 2007). Por el contrario, al trasplantar un número bajo de células caracterizadas como CMTs, sí se consigue generar un nuevo tumor (**Fig. 20**).

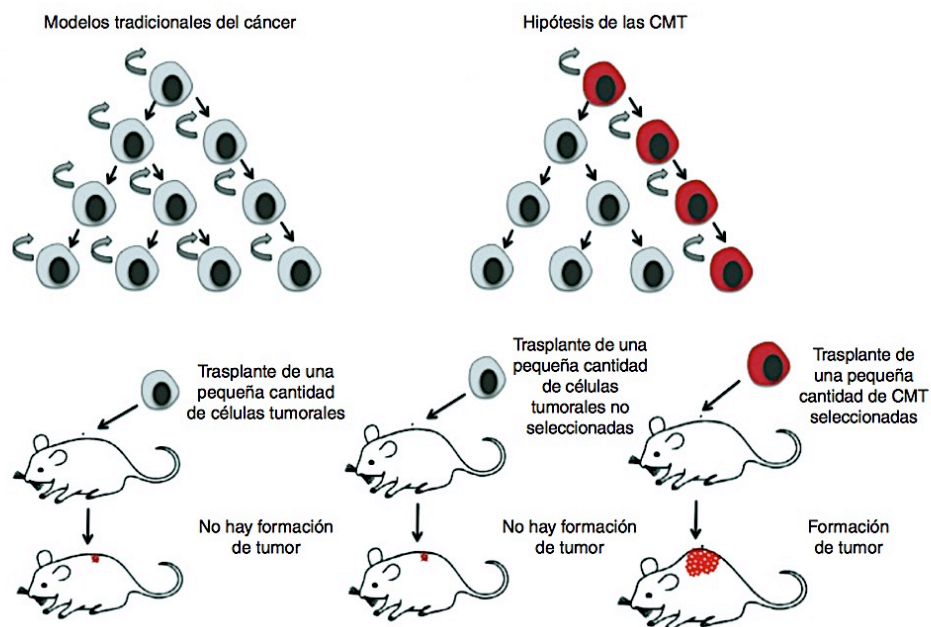


Figura 20. Representación gráfica de los modelos tradicional y de las CMTs del cáncer. *Izquierda.* El modelo tradicional o estocástico considera que todas las células de un tumor tienen las mismas capacidades de mantenimiento y expansión del mismo. *Derecha.* El modelo jerárquico de las CMTs considera que solamente una subpoblación del tumor es capaz de generar nuevos tumores (extraída de Eguiara y cols., 2012 –modificada de Chandler y Lagasse, 2010-).

El análisis de expresión génica de tumores característicamente agresivos ha mostrado un importante solapamiento entre su perfil de expresión génica y el de células madre adultas del mismo tejido (Ben-Porath y cols., 2008; Eppert y cols, 2011). Todas estas evidencias, tomadas en conjunto, demostrarían la existencia de una población de células con características de CMT responsables de la formación, el desarrollo y la dispersión del tumor.

El origen de las CMTs en tumores sólidos como el cáncer de mama es aún hoy objeto de debate. El modelo jerárquico lineal de las CMTs hace intuitivo considerar que el origen de las CMTs sean las propias CMAs o progenitores muy tempranos del propio tejido, las cuales sufrirían eventos mutagénicos y adquirirían el fenotipo de célula madre tumoral. (Badve y Nakshatri, 2012; **Fig. 21**). En este modelo, las CMTs supondrían una población de células pequeñas con mayor capacidad tumorigénica capaces de dar lugar a una progenie de células tumorales más diferenciadas (Visvader y Lindeman, 2008).

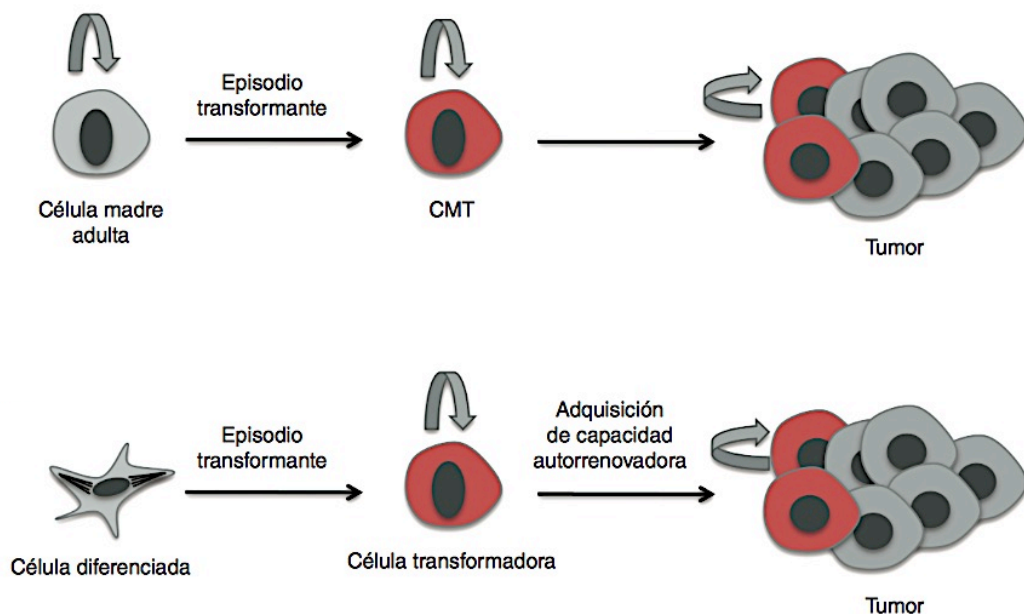


Figura 21. Representación gráfica de los modelos de formación de las CMTs. *Arriba.* Las CMTs se originan a partir de episodios transformantes de las CMAs. *Abajo.* Células diferenciadas sin capacidad de auto-renovación son capaces de adquirir las capacidades de CMT mediante procesos de reprogramación nuclear (extraída de Eguiara y cols., 2012).

Una segunda hipótesis propone que las CMTs podrían originarse a partir de cualquier tipo celular diferenciado a través de procesos como la transición epitelio-mesénquima (ver más abajo) o la reprogramación celular. Existen similitudes entre el proceso de reprogramación nuclear y la transformación de las células tumorales. En ambos procesos se requiere la intervención de combinaciones específicas de oncogenes y genes supresores de tumores que dan lugar a células con menor grado de diferenciación y con características de células madre. Los cuatro factores de transcripción utilizados originalmente por el Premio Nobel de Medicina 2012 Shinya Yamanaka para reprogramar células somáticas en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*), Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, están sobre-expresados en varios tipos tumorales, y se han relacionado con las características específicas de las CMTs (Knoepfler, 2008; Cheng y cols., 2008; **Fig. 21**).

En la literatura pueden encontrarse diferentes nombres para referirse a este tipo celular, tales como “células iniciadoras de tumor” (CITs), “células propagadoras de tumor” (CPTs) o “células tipo célula madre” (del inglés *stem-like cancer cells*). CMT (“célula madre tumoral”) es una definición funcional, siendo la más utilizada y refiriéndose a aquellas células con la capacidad de generar tumores seriados *in vivo*, recapitulando parcialmente la heterogeneidad celular del tumor original (Owens y Naylor, 2013).

1.8.2. Células madre mamarias

La glándula mamaria es un tejido altamente dinámico que se desarrolla a partir de un pequeño número de células invasoras derivadas del ectodermo (Stingl y cols., 2006). La mayor parte del desarrollo de la glándula mamaria tiene lugar después del nacimiento y bajo un estricto control hormonal, sufriendo su epitelio grandes cambios morfológicos durante la pubertad, el embarazo, la lactancia y durante la menopausia (Russo y Russo, 2004). Estos cambios en los niveles de proliferación, diferenciación y apoptosis, provocan una extenuación de las células, perdiendo su capacidad de proliferación al llegar al estado más diferenciado. Para reemplazar estas células existen progenitores celulares más primitivos, a los que a su vez reemplaza una jerarquía de progenitores con niveles de “indiferenciación” crecientes según se alcanza lo más alto

de la jerarquía mamaria hasta llegar a la célula madre mamaria “indiferenciada” (Luo y cols, 2010).

La existencia de células madre mamarias se sugirió por primera vez en 1996 tras la observación de pérdida de heterocigosidad y la aparición de las consecuentes alteraciones cromosómicas en regiones del epitelio mamario adyacentes al tejido tumoral (Deng y cols., 1996). En 2001, Stingl y cols. demostraron la heterogeneidad de los progenitores celulares presentes en el tejido mamario adulto. Mediante marcajes de membrana y ensayos de clonogenicidad realizados *in vitro* con células epiteliales de la mama, distinguieron tres tipos de progenitores de células epiteliales con diferentes grados de multipotencia (progenitores luminales, progenitores bipotentes y progenitores mioepiteliales). En 2007, Ginestier y cols. demostraron mediante la utilización del sustrato fluorescente ALDEFLUOR® que las células del epitelio mamario con características de células madre o progenitoras eran aquellas con mayor actividad del enzima Aldehído Deshidrogenasa 1 (ALDH1). Por otro lado, se han venido utilizando una serie de marcadores de membrana para la identificación de la población de células madre mamarias. En 2006 se identificó una población de células madre en la glándula mamaria de ratón con el fenotipo $CD29^{alto} CD24^{+} Lin^{-}$ (Shackleton y cols., 2006).

1.8.3. CMTs en el cáncer de mama

Las CMTs en cáncer de mama fueron las primeras CMTs descritas en tumores sólidos y han sido ampliamente estudiadas. Al-Hajj y cols. (2003), mediante el empleo de los marcadores de membrana CD44 y CD24 en tumores de mama de pacientes, demostraron que la población $CD44^{+}CD24^{-/bajo} Lin^{-}$ tiene una capacidad de formar tumores en ratones inmunodeprimidos NOD/SCID significativamente mayor que la población $CD44^{-}CD24^{-/alto} Lin^{-}$. Además experimentos de pases seriados demostraron que los tumores formados por células $CD44^{+}CD24^{-/bajo} Lin^{-}$ poseían capacidad de autorrenovación y eran capaces de reproducir la heterogeneidad celular del tumor inicial. En los últimos años se han desarrollado una serie de métodos para la identificación y aislamiento de poblaciones celulares con características de CMT en el cáncer de mama (**Fig. 22**):

- Marcadores de Membrana: Desde su descubrimiento en 2003, el fenotipo $CD44^+CD24^{-/bajo} Lin^-$ ha sido ampliamente utilizado para identificar una serie de células con características de CMTs (Camerlingo y cols., 2014), las cuales son capaces de formar tumores en ratones inmunosuprimidos al inyectar solamente 200 células y presentan una alta expresión de genes característicos de las células madre (Shipitsin y cols., 2007). CD44 es un receptor transmembrana que se une al ácido hialurónico en la matriz extracelular para inducir la activación de la cascada de señalización PI-3K e inducir la reorganización del citoesqueleto facilitando la adhesión e invasión (Ghatak y cols., 2005).
- Cultivo de esferas en suspensión: Ponti y cols. (2005) demostraron que las células capaces de sobrevivir en suspensión en condiciones no-diferenciadoras formando colonias flotantes, denominadas “mamosferas”, y derivadas de tumores de mama, estaban enriquecidas en CMTs.
- Actividad Aldehído Deshidrogenasa (ALDH): El grupo de Max Wicha descubrió que las células provenientes tanto de tejido mamario normal como de tumores que presentaban una mayor actividad para el enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) también presentaban características que definen a las CMTs. Las denominadas células $ALDH^+$ fueron capaces de generar tumores recapitulando la heterogeneidad del tumor original, además de correlacionar con un peor pronóstico en una serie de 577 carcinomas de pacientes (Ginestier y cols., 2007).
- Exclusión de colorante (*side population*): En el año 2005 se asoció por primera vez la población conocida como SP (del inglés *side population*) con la presencia de CMTs en la línea celular de cáncer de mama MCF7. Se observó que alrededor de un 2% de las células del cultivo poseían la capacidad para excluir el colorante de DNA Hoechst 33342 (SP), siendo la única fracción tumorigénica de MCF7, demostrando la existencia de jerarquías celulares, orquestadas por una población celular con características de CMTs en las líneas celulares (Charafe-Jauffret y cols., 2009a).

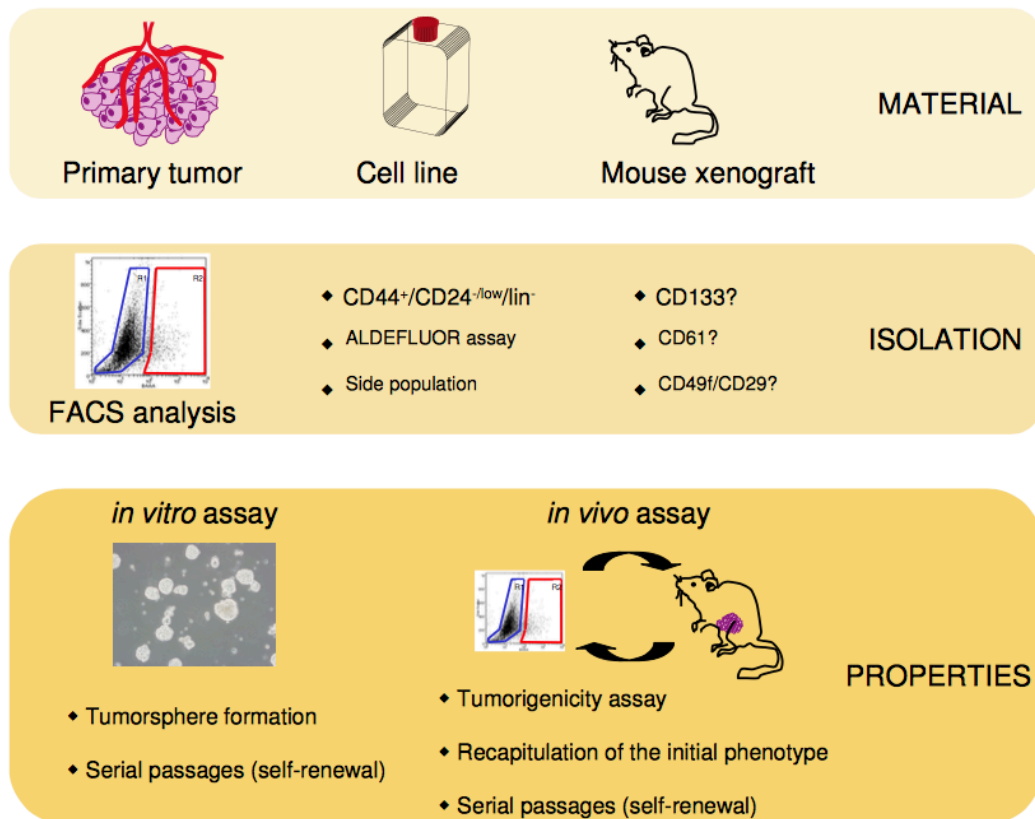


Figura 22. Modelos y marcadores para el estudio de células madre de cáncer de mama. Se representan los ensayos principales, modelos y marcadores para estudiar las células madre de cáncer de mama. Los modelos y ensayos se basan en las características principales de las células madre, que son la capacidad de auto-renovación y el potencial de diferenciación. Los diversos marcadores ilustran la gran diversidad fenotípica de la población de células madre tumorales (extraída de Charafe-Jauffret y cols., 2009b).

Se ha observado que la población de células donde se solapa la expresión de ALDH1 y el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ son más tumorigénicas que las células que expresan sólo uno de los dos marcadores (Ginestier, 2007). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la expresión de estos marcadores es heterogénea y no todos los tumores presentan una población de células positiva para los marcadores habitualmente empleados para la caracterización de CMTs en el cáncer de mama.

1.8.4. CMTs, plasticidad celular y TEM

Recientemente el grupo de Weinberg ha puesto de manifiesto la plasticidad de las células epiteliales del cáncer de mama. Células extraídas de tumores de mama con un perfil de marcadores de membrana correspondiente a células basales (CD44^{bajo}/CD24⁺/ESA⁻) son capaces de transformarse espontáneamente para dar lugar a una población celular con el perfil característico de las CMT mesenquimales (CD44⁺/CD24⁻/ESA⁻) (Chaffer, 2011).

En líneas celulares establecidas de cáncer de mama se ha observado que la activación de la vía Activina/Nodal en células con el fenotipo $CD44^+/CD24^+$ característico de células luminales también es capaz de generar una progenie mesenquimal $CD44^+/CD24^-$ con mayor tumorigenicidad, siendo este proceso bidireccional (Meyer y cols., 2009).

Los resultados anteriores han llevado a la elaboración de modelos matemáticos de predicción probabilística del equilibrio fenotípico del tumor. Utilizando el modelo matemático de Markov, se ha demostrado que el cambio en el estado de una célula cancerígena no está determinado por su memoria celular previa, sino por su habilidad a la hora de mantener el equilibrio y alcanzar un estado estable. Por ejemplo, tras separar las células tumorales en tres sub-poblaciones de células luminales, basales y CMTs en función de los niveles de expresión de los marcadores de membrana CD44, CD24 y EpCAM, se observó que estas sub-poblaciones eran capaces de cambiar su fenotipo a lo largo del tiempo hasta lograr de nuevo el equilibrio inicial de la población original, alcanzándose la misma proporción de células CMTs que en la línea celular parental (Gupta y cols., 2011; **Fig. 23**).

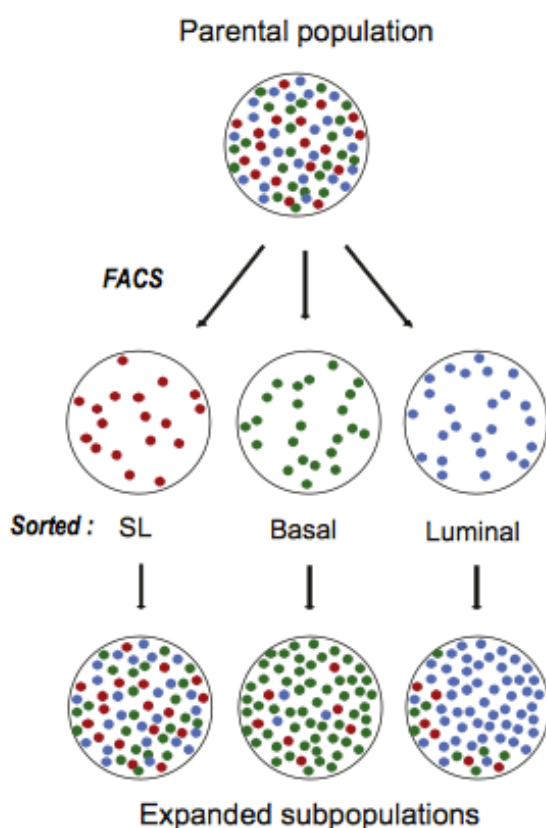


Figura 23. Interconversión de los estados fenotípicos en las poblaciones de células tumorales. Representación esquemática del procedimiento empleado para determinar las dinámicas de transición entre estados celulares. (extraída de Gupta y cols., 2011; FACS: Fluorescence-activated cell sorting; SL: Stem-like cells)

activa durante la cicatrización y se ha observado en casos de fibrosis. Durante el desarrollo tumoral se ha observado que durante la metástasis las células epiteliales del tumor adquieren un fenotipo móvil mesenquimal mediante la TEM, invadiendo tejidos distantes y colonizando nuevos nichos donde podría activarse un proceso inverso de transición mesénquima-epitelio (TME) (Visvader y cols., 2008). Se ha observado que ciertas señales del microambiente tumoral que promueven la TEM (p. ej. TGFβ, Notch, EGF, Hedgehog, Wnt) incrementan también las propiedades de CMT en células no tumorogénicas mediante la puesta en marcha de alteraciones epigenéticas (Mani y cols., 2008; Polyak y Weinberg, 2009). Sin embargo la habilidad de estos factores para inducir el fenotipo de CMT podría variar en función del tipo celular donde se genere la TEM. Por ejemplo, el factor de transcripción *SLUG*, que promueve la TEM, favorece la adquisición de un fenotipo de CMT cuando se sobre-expresa en progenitores luminales diferenciadas (Guo y cols., 2012). Estudios muy recientes (Liu y cols., 2013) han postulado que en un tumor pueden co-existir poblaciones de CMTs altamente proliferativas en el interior (que expresarían el marcador ALDH⁺ y un fenotipo TME), mientras que en el frente invasivo se localizarían CMTs no proliferativas y altamente invasivas (CD44⁺CD24^{-/bajo} y un fenotipo TEM).

A la hora de conocer la biología de las CMTs es importante descifrar las relaciones de éstas con su microambiente y los mecanismos implicados. Existen numerosas evidencias de la interacción entre el tumor y el microambiente tumoral, lo que finalmente altera de manera recíproca la evolución de ambos compartimentos tumorales (Hanahan y Weinberg, 2011). Uno de los tipos celulares más abundantes dentro del microambiente celular son los fibroblastos, conocidos como fibroblastos asociados a tumor (FATs), los cuales presentan un fenotipo alterado respecto a los fibroblastos presentes en el tejido sano contiguo al tumor (Haviv y cols., 2009). Estos FATs son los responsables de proporcionar una amplia variedad de quimioquinas, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular que contribuyen activamente a la progresión tumoral (Allen y Jones, 2011). Se ha descrito que los FATs y su matriz asociada favorecen la inducción de la TEM y la adquisición de una morfología mesenquimal que incrementa la diseminación de células epiteliales premalignas no tumorales *in vivo*, lo cual no sucede con el empleo de fibroblastos,

procedentes de una mama normal (Soon y cols., 2013). Por tanto, es plausible que los FATs contribuyan al mantenimiento del fenotipo de CMT por medio de la inducción de la TEM en células del tumor diferenciadas, formando parte del sistema dinámico de generación de estados CMT (**Fig. 24**, modelo II).

I.8.5. CMTs, resistencia al tratamiento y nuevas terapias anti-CMT

Los tumores están formados por poblaciones heterogéneas de distintos tipos celulares con diferente potencial tumorigénico, siendo las CMTs la población responsable del mantenimiento del crecimiento tumoral. Tanto los estudios *in vitro* como *in vivo* han sugerido repetidamente que las CMTs presentan una mayor resistencia a los tratamientos con las terapias convencionales (quimioterapia, radioterapia, hormonoterapia) contra el cáncer (Dylla y cols., 2008). Ésto sitúa a las CMTs como responsables no solo del crecimiento tumoral sino también de las recidivas y los procesos metastásicos.

Los tratamientos convencionales contra el cáncer están dirigidos hacia células tumorales con una proliferación rápida que constituyen una parte importante de la masa o grueso del tumor, obviando los mecanismos de auto-renovación característicos de las CMTs. En los últimos años se ha postulado repetidamente que será necesaria una terapia mixta capaz de eliminar tanto las CMTs como el resto de células del grueso del tumor para poder controlar y curar la mayoría de cánceres (Ablett y cols., 2012). Por tanto, las terapias específicas anti-CMTs deberían dirigirse contra las cuatro características específicas de su biología que ya hemos expuesto:

- Inhibición de la capacidad de auto-renovación de las CMTs.
- Inducción de la diferenciación o apoptosis de las CMTs.
- Bloqueo de los mecanismos de resistencia presentes intrínsecamente en las CMTs.
- Terapias contra las señales microambientales que favorecen la generación y el mantenimiento de estados CMT.

II. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El subtipo basal-HER2 del cáncer de mama: Evidencias preliminares. En el año 2010, nuestro grupo de investigación sugirió por primera vez que un nuevo subtipo de cáncer de mama denominado “basal-HER2”, definido por la presencia de amplificación del oncogén HER2 en un fenotipo molecular de tipo basal, presentaba resistencia primaria a trastuzumab (Oliveras-Ferraros y cols., 2010, 2012). Cuando nuestro grupo de investigación revisó la expresión de diversos factores de transcripción de la TEM, tales como *SLUG/SNAIL2*, en una serie de 51 líneas celulares de cáncer de mama organizadas por los subtipos moleculares intrínsecos (Neve y cols., 2006), se concluyó que todas las líneas celulares de tipo “basal/HER2+” con niveles elevados de *SLUG/SNAIL2* presentaban resistencia primaria a trastuzumab (**Fig. 25**). Dichos estudios sugirieron la posible existencia de una correlación entre el carácter “luminal” de las células HER2+ y su sensibilidad a trastuzumab y entre el carácter “basal” de las células HER2+ y su resistencia primaria a trastuzumab.

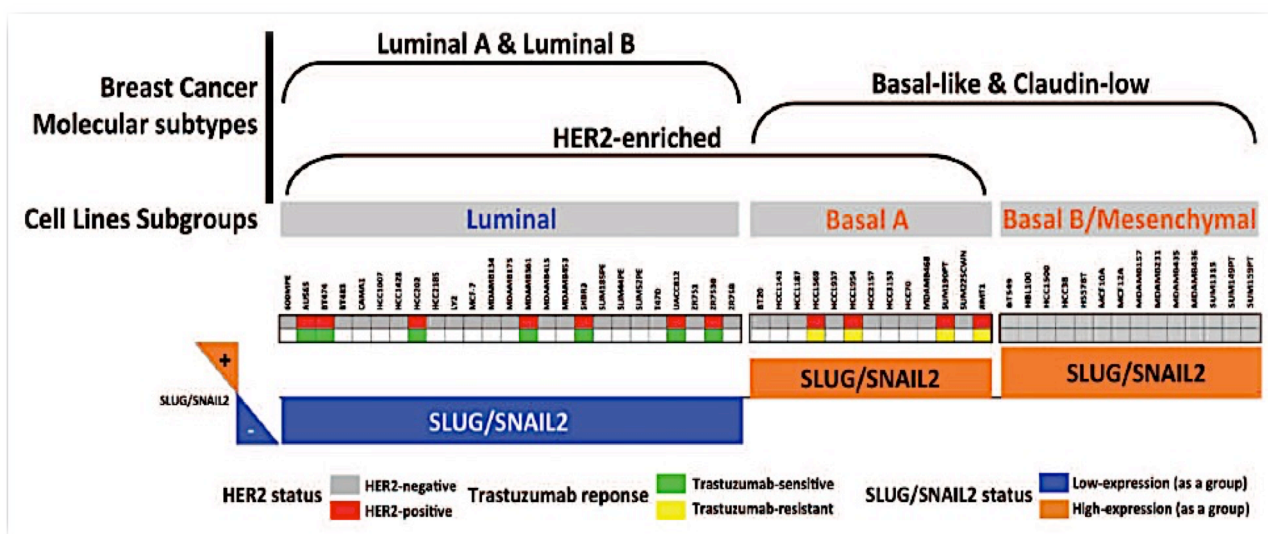


Figura 25. Asociación de los subtipos moleculares de líneas celulares de cáncer de mama con la respuesta primaria al anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab. La relación entre los subtipos moleculares de las líneas celulares de cáncer de mama (luminal, basal-A, basal-B/mesenchymal) y los subtipos moleculares del cáncer de mama (luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like, claudin-low) fue reevaluada teniendo en consideración el estado de amplificación del gen HER2, la respuesta primaria a trastuzumab, y el estado de expresión del factor de transcripción activador de la TEM *SLUG/SNAIL2*. El grupo de líneas celulares “basal/HER2+” fueron todas ellas resistentes *de novo* a trastuzumab, un fenómeno acompañado con niveles elevados del factor transcripcional de la TEM *SLUG/SNAIL2*. Por el contrario, todas las líneas celulares sensibles a trastuzumab se situaron en el subgrupo Luminal/HER2+, caracterizado por la ausencia de *SLUG/SNAIL2* (extraída de Oliveras-Ferraros, 2012).

A nivel clínico, el trabajo de Harris y cols. (2007b) fue el primero en sugerir que los tumores HER2+ que sobreexpresaban genes asociados con el fenotipo basal, incluyendo una elevada expresión de genes que codificaban para CKs basales, eran más frecuentes en el grupo de pacientes que no respondían a trastuzumab previo a la cirugía. La posible existencia del subtipo basal/HER2+ también había sido sugerida a través de perfiles de biomarcadores inmunohistoquímicos. Cuando Laakso y cols. (2006) reclasificaron los cánceres de mama de tipo basal según su grado de expresión de CKs basales, aquellos tumores con baja-moderada expresión de CKs basales fueron más proclives a presentar una sobre-expresión de HER2 simultáneamente. De manera similar, Liu y cols. (2008) describieron un pequeño grupo de tumores de mama con receptores hormonales negativos que, sorprendentemente, sobre-expresaban de forma simultánea HER2 y marcadores basales. Ambos estudios concluyeron que las pacientes con tumores del subtipo basal/HER2+ tenían significativamente peor pronóstico que las pacientes con tumores HER2+ o tumores de tipo basal. Más aún, Bhargava y cols. (2010), y nuestro propio grupo (Oliveras-Ferraro y cols., 2010) observaron que muchas de las características inmunohistoquímicas y morfológicas generalmente adscritas a los tumores basales, tales como la aparición de amplias zonas de necrosis e infiltración linfocítica, podían ser observadas también en algunos tumores HER2+ que expresaban CKs basales.

Por otro lado, un número creciente de evidencias ha comenzado a desvelar un nexo existente entre los tumores de tipo basal, el fenotipo mesenquimal de las CMTs, la TEM y la adquisición de un mayor potencial tumorigénico, invasivo y metastásico (Hugo y cols., 2007; Sarrió y cols., 2008; Stingl y Caldas, 2007; Storci y cols., 2008), lo que podría sugerir que la resistencia primaria a trastuzumab en el subtipo basal/HER2+ se relaciona con la presencia de CMTs de tipo mesenquimal.

El subtipo basal-HER2 del cáncer de mama: Necesidad de una caracterización clínico-molecular y de sus implicaciones terapéuticas. El cáncer de mama clínicamente HER2+ (cHER2+), determinado exclusivamente mediante inmunohistoquímica de la sobre-expresión de la proteína HER2 y/o fluorescencia de hibridación *in situ* de la amplificación del gen HER2, ha sido considerado clásicamente

como una única enfermedad en términos de pronóstico clínico y sensibilidad al anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab. Sin embargo, aunque el uso adyuvante y neoadyuvante de trastuzumab reduce de forma significativa el riesgo de recaída en mujeres con cáncer de mama temprano cHER2+ cuando se añade a la quimioterapia estándar, no todos los casos obtienen el mismo beneficio si se tiene en cuenta el elevado número de pacientes que desarrollan recurrencia de la enfermedad. Desafortunadamente, la identificación de un predictor clínico robusto indicativo del beneficio de trastuzumab, incluyendo el mismo HER2, continúa siendo en la actualidad un reto en el entorno adyuvante y neoadyuvante de esta enfermedad.

Este trabajo de investigación surge de la necesidad de confirmar la existencia de un subgrupo de tumores de mama intrínsecamente agresivos y con posible resistencia primaria a trastuzumab a los cuales hemos denominado “basal-HER2+”, los cuales se originarían cuando la sobre-expresión del oncogén HER2 tiene lugar en los tumores de tipo basal generalmente HER2-negativos y que, *a priori*, podrían estar enriquecidos en fenotipos mesenquimales incluyendo los de sus CMTs.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Este estudio plantea dos hipótesis:

- 1). La sobre-expresión de HER2 puede tener lugar en un subtipo molecular de cáncer de mama denominado basal (un subgrupo de tumores hasta ahora considerados como HER2-negativos y enriquecidos con características mesenquimales), generando de esta manera un nuevo fenotipo de cáncer de mama denominado “basal/HER2”.
- 2). El fenotipo basal/HER2 confiere mal pronóstico y define a un subgrupo de pacientes con cánceres de mama clínicamente HER2+, intrínsecamente agresivos y con resistencia primaria a trastuzumab.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este estudio tiene cuatro objetivos:

- 1). Confirmar la existencia de un fenotipo basal/HER2 en el cáncer de mama mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas que detecten la co-expresión de la citoqueratina basal CK5/6 en tumores que sobre-expresan HER2.
- 2). Medir el impacto del fenotipo basal/HER2 sobre la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad, y el tiempo al fallo de tratamiento de las pacientes con cáncer de mama HER2+ tratadas con terapias adyuvantes y neoadyuvantes basadas en trastuzumab.
- 3). Desarrollar un nuevo modelo teórico que explique como el peor pronóstico y la resistencia *de novo* a trastuzumab de los tumores con fenotipo basal/HER2 puede explicarse en términos de características mesenquimales tales como la firma CD44⁺CD24^{-/bajo} de las CMTs.
- 4). Ofrecer nuevos abordajes terapéuticos en el manejo del cáncer de mama basal/HER2 con resistencia primaria a trastuzumab.

RESULTADOS

Estudio #1

Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer

ONCOTARGET-2015

[DOI: 10.18632/oncotarget.3106](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3106)

Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant Basal-HER2 subtype of breast cancer

Begoña Martín-Castillo^{1,2}, Eugeni López-Bonet^{2,3}, Maria Buxó^{2,4,5}, Joan Dorca⁶, Francesc Tuca-Rodríguez⁷, Miguel Alonso Ruano⁷, Ramon Colomer^{8,9}, Javier A. Menendez^{2,10}

¹Unit of Clinical Research, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain

²Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Molecular Oncology Group, Girona, Catalonia, Spain

³Department of Anatomical Pathology, Dr. Josep Trueta Hospital of Girona, Girona, Catalonia, Spain

⁴Epidemiology Unit and Cancer Registry of Girona (UERG), Catalan Cancer Plan, Catalan Health Government, Girona, Catalonia, Spain

⁵Department of Nursing, Universitat de Girona (UdG), Girona, Catalonia, Spain

⁶Medical Oncology Department, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain

⁷Department of Gynecology, Dr. Josep Trueta Hospital of Girona, Girona, Catalonia, Spain

⁸Breast Cancer Clinical Research Unit, CNIO-Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain

⁹Medical Oncology Department, Hospital La Princesa, Madrid, Spain

¹⁰Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology (ICO), Girona, Catalonia, Spain

Correspondence to:

Javier A. Menendez, e-mail: jmenendez@iconcologia.net, jmenendez@idibgi.org

Keywords: Breast cancer, HER2, basal-like, trastuzumab, cytokeratins

Received: December 22, 2014

Accepted: January 08, 2015

Published: January 29, 2015

ABSTRACT

There is an urgent need to refine the prognostic taxonomy of HER2+ breast carcinomas and develop easy-to-use, clinic-based prediction algorithms to distinguish between good- and poor- responders to trastuzumab-based therapy. Building on earlier studies suggesting that HER2+ tumors enriched with molecular and morpho-immunohistochemical features classically ascribed to basal-like tumors are highly aggressive and refractory to trastuzumab, we investigated the prognostic and predictive value of the basal-HER2+ phenotype in HER2-overexpressing tumors. Our retrospective cohort study of a consecutive series of 152 HER2+ primary invasive ductal breast carcinomas first confirmed the existence of a distinct subgroup co-expressing HER2 protein and basal cytokeratin markers CK5/6, the so-called basal-HER2+ phenotype. Basal-HER2+ phenotype ($\geq 10\%$ of cells showing positive CK5/6 staining), but not estrogen receptor status, was significantly associated with inferior overall survival by univariate analysis and predicted worsened disease free survival after accounting for strong prognostic variables such as tumor size at diagnosis in stepwise multivariate analysis. In the sub-cohort of HER2+ patients treated with trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapy, basal-HER2+ phenotype was found to be the sole independent prognostic marker for a significantly inferior time to treatment failure in multivariate analysis. A CK5/6-based immunohistochemical fingerprint may provide a simple, rapid, and accurate method for re-classifying women diagnosed with HER2+ breast cancer in a manner that can improve prognosis and therapeutic planning in patients with clinically aggressive basal-HER2+ tumors who are not likely to benefit from trastuzumab-based therapy.

In women with early-stage breast cancer, adjuvant use of the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab reduces recurrence risk when added to standard chemotherapy [1, 2]. However, not all cases of HER2+ breast tumors derive similar benefit from trastuzumab because a significant number of patients develop disease recurrence. At present, clinicians rely on established markers of HER2 expression for selecting patients for adjuvant trastuzumab or neoadjuvant pertuzumab-trastuzumab therapy i.e., immunohistochemical expression at the 3+ level or FISH ratio of 2 or greater [3]. Biomarkers to identify those patients who are not likely to benefit from trastuzumab would be clinically useful, allowing patients to pursue other therapeutic options. A predictive biomarker to classify a subgroup of patients with HER2+ tumors that are particularly resistant to trastuzumab could be especially important in the adjuvant setting, where the effectiveness of a given therapy in an individual patient cannot be assessed. Unfortunately, the identification of a robust clinical or molecular predictor of adjuvant trastuzumab benefit, including HER2 itself, has proven challenging [4–8].

Earlier work by Harris *et al.* [9], demonstrated that a particular HER2+ tumor phenotype overexpressing genes associated with the basal-like phenotype, including higher expression of basal cytokeratins (CKs), was more frequent in the non-responding group of patients receiving pre-operative trastuzumab than in the responding group. Building on these pioneering findings and considering that trastuzumab sensitivity is notably restricted to luminal-HER2+ breast cancer cell lines, whereas all basal-HER2+ cell lines exhibit inherent primary resistance to trastuzumab [10], we recently proposed that a basal CK surrogate definition of HER2+ breast carcinomas might define subgroups of patients likely to display resistance to trastuzumab-based therapy. Although published data on HER2+ and basal phenotype are limited, the longstanding assumption that HER2+ and basal-like breast cancers are mutually exclusive entities is open to dispute. While the first molecular portraits of breast tumors using DNA microarrays suggested that breast carcinomas with a basal phenotype are HER2 non-amplified [11], subsequent refined analyses tended to include HER2-amplified tumors branching close or included in a *bona fide* basal-like subclass [12–15]. Beyond microarray-based gene profiling studies, the so-called basal-HER2+ subtype has been also identified by immunohistochemical biomarker profiles. When Laakso *et al.* segregated basal-like breast cancers based on immunohistochemical expression of basal CKs, those tumors with low basal CK expression were likely to have HER2 overexpression [16]. Similarly, Liu *et al.* described a small group of hormone receptor-negative tumors simultaneously expressing HER2 and basal markers [17]. Both studies found that patients with the basal-HER2+ subtype had a significantly worse prognosis than those with basal-like and HER2+ tumors. Bhargava *et al.* [18] and our own group [19] observed that

many morphological and immunohistochemical features classically ascribed to basal-like tumors, including large geographic necrosis and lymphoid infiltrate, are commonly seen in basal-HER2+ tumors. Bagaria *et al.* [20] have recently confirmed that when luminal-HER2+ (ER-positive and basal CK-negative), HER2+ (ER-negative and basal CK-negative) and basal-HER2+ (ER-negative and basal CK-positive) were correlated with clinicopathological features and overall survival, the basal-HER2+ subtype was associated with the worst prognosis.

Collectively, the results from these studies strongly support the notion that the basal-HER2+ phenotype may delineate a distinct entity of biologically-aggressive breast carcinomas; however, whether the basal-HER2+ phenotype also has clinical utility as a predictive marker of resistance to trastuzumab-based therapy remains to be clarified. Beyond confirming that the basal-HER2+ phenotype can predict worse disease-free and overall survival, we have also evaluated whether immunohistochemical-based identification of the basal-HER2+ phenotype can predict resistance to trastuzumab-based adjuvant therapy, which may have crucial implications for patients originally identified as suitable for trastuzumab based solely on their HER2+ phenotype. We show here that a simple CK5/6-based fingerprint using a 10% positivity cutoff, allows the re-classification of HER2+ tumors in a manner that improves prognosis and therapeutic planning in a subclass of patients with clinically aggressive basal-HER2+ tumors that are not likely to benefit from trastuzumab-based therapy.

RESULTS

Clinicopathological features

Breast cancer tissue sections of 154 consecutive patients with HER2-overexpressing primary invasive ductal breast cancer were evaluated for expression of ER and CK5/6 by IHC: 89 (58%) tumors were luminal-HER2+, 39 (26%) tumors were HER2+, and 24 (16%) tumors were basal-HER+ (Table 1). Representative examples of HER2+ breast carcinomas expressing basal epithelial CK markers (CK5/6) are shown in Figure 1.

Patients with basal-HER2+ tumors were more likely to have larger tumors ($P = 0.011$) and recurrence ($P = 0.007$) than those with luminal-HER2+ and HER2+ tumors. There were no differences in age at diagnosis, tumor size, nodal status, and tumor grade between patients with luminal-HER2+ and HER2+ tumors. There were no differences in the use of adjuvant trastuzumab and chemotherapy across the three HER2+ groups. Patients with luminal-HER2+ tumors were more likely to receive hormone therapy than patients with HER2+ and basal-HER2+ tumors ($P < 0.001$) (Table 1).

Table 1: Patient and tumor characteristics

Characteristic	Luminal-HER2+ <i>n</i> (%)	Basal-HER2+ <i>n</i> (%)	HER2+ <i>n</i> (%)	Basal-HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Luminal-HER2+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}
No. of patients	89 (58.6)	24 (15.8)	39 (25.7)		
Age, years, mean \pm SD	58.2 \pm 16.4	63.1 \pm 15.3	56.67 \pm 14.2	0.130 ^{*1}	0.591 ^{*1}
Tumor size					
T1	34 (38.2)	3 (12.5)	13 (33.3)	0.011 / 0.008 ^{*2}	0.350 / 0.345 ^{*2}
T2	41 (46.1)	10 (41.7)	17 (43.6)		
T3+T4	6 (6.7)	8 (33.3)	7 (17.9)		
Inflammatory	5 (5.6)	2 (8.3)	2 (5.1)		
Unknown	3 (3.4)	1 (4.2)	0 (0.0)		
Node status					
Negative	42 (47.2)	7 (29.2)	19 (48.7)	0.177 / 0.097 ^{*2}	0.566 / 0.943 ^{*2}
Positive	43 (48.3)	16 (66.7)	20 (51.3)		
Unknown	4 (4.5)	1 (4.2)	0 (0.0)		
Tumor grade					
1	3 (3.4)	0 (0.0)	1 (2.6)	0.934 / 0.892 ^{*2}	0.435 / 0.478
2	25 (28.1)	5 (20.8)	8 (20.5)		
3	43 (48.3)	14 (58.3)	25 (64.1)		
Unknown	18 (20.2)	5 (20.8)	5 (12.8)		
Adjuvant trastuzumab					
No	40 (44.9)	13 (54.2)	20 (51.3)	0.514 / 0.738 ^{*2*b}	0.793 / 0.594 ^{*2*b}
Yes	42 (47.2)	11 (45.8)	17 (43.6)		
Unknown	7 (7.9)	0 (0.0)	0 (0.0)		
Adjuvant chemotherapy					
No	21 (23.6)	4 (16.7)	8 (20.5)	0.143 / 0.394 ^{*2*b}	0.878 / 0.647 ^{*2*b}
Yes	57 (64.0)	20 (83.3)	27 (69.2)		
Unknown	11 (12.4)	0 (0.0)	4 (10.3)		
Adjuvant hormone therapy					
No	7 (7.9)	21 (87.5)	37 (94.4)	<0.001 / <0.001 ^{*2*b}	<0.001 / <0.001 ^{*2*b}
Yes	71 (79.8)	3 (12.5)	2 (5.1)		
Unknown	11 (12.4)	0 (0.0)	0 (0.0)		
First clinically relevant event					
Local recurrence	1 (1.1)	2 (8.3%)	1 (2.6)	0.007 / 0.004 ^{*2}	0.699 / 0.861 ^{*2}
Distant metastasis	11 (12.4)	7 (29.2)	7 (18.4)		
Contralateral breast cancer	0 (0.0)	2 (8.3)	0 (0.0)		
Second primary tumor	5 (5.6)	1 (4.2)	2 (5.3)		
Not occurred	58 (65.2)	9 (37.5)	24 (63.2)		

(Continued)

Characteristic	Luminal-HER2+ <i>n</i> (%)	Basal-HER2+ <i>n</i> (%)	HER2+ <i>n</i> (%)	Basal-HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Luminal-HER2+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}
Unknown	8 (9.0)	1 (4.2)	1 (2.6)		
Death from other causes	6 (6.7)	2 (8.3)	3 (7.9)		
First metastases site					
Not occurred	79 (88.8)	17 (70.8)	33 (84.6)	0.084	0.773
Visceral	3 (3.4)	2 (8.3)	1 (2.6)		
No visceral	4 (4.5)	2 (8.3)	3 (7.7)		
Both	3 (3.4)	3 (12.5)	2 (5.1)		

*¹ Parametric test: Independent two-sample Student's *t* test

*² excludes unknown category

*^a Fisher's exact test

*^b Chi-square test

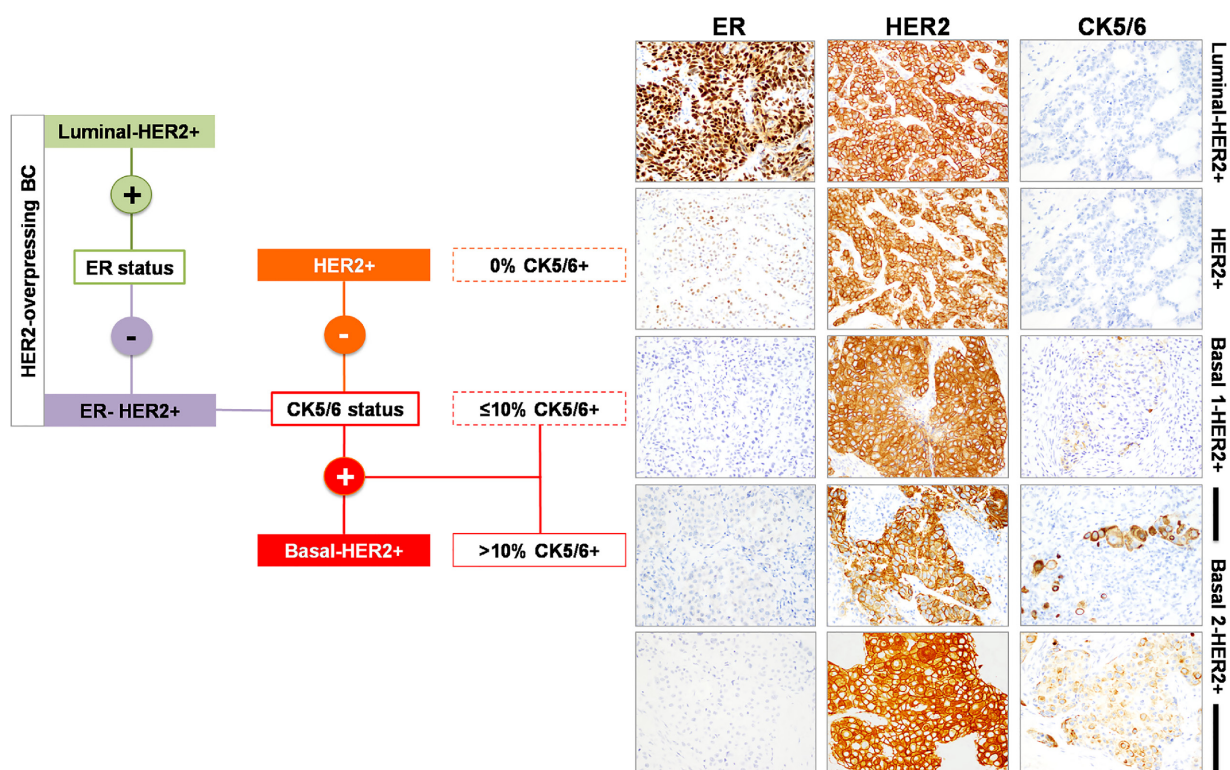


Figure 1: Immunophenotypic classification of HER2-overexpressing breast carcinomas.

To exclude equivocal reactions, clinicopathological features were reassessed after stratification of the basal-HER2+ tumors (CK5/6 staining score > 0) to underlying CK5/6 expression pattern: basal 1-HER2+ (<10% of cells showing positive staining) and basal 2/HER2+ (≥10% of cells showing positive staining) (Table 2). When a positive CK5/6 staining in ≥ 10% of the HER2+ breast cancer tissue sections was registered as a diagnostically relevant positive

reaction [21], patients with basal 2-HER2+ tumors (but not basal 1-HER2+ tumors) were older ($P = 0.034$) and more likely to have larger tumors ($P = 0.003$) and recurrence ($P < 0.001$) than those with luminal-HER2+ and HER2+ tumors. When compared to HER2+ tumors, patients with basal 2-HER2 tumors (but not basal 1-HER2+ tumors) were older ($P = 0.035$) more likely to have larger tumors ($P = 0.022$) and recurrence ($P = 0.012$) (Table 2).

Table 2: Patient and tumor characteristics (stratification by CK5/6 expression status)

Characteristic	Luminal- HER2+	Basal 1-HER2+	Basal 2-HER2+	HER2+	Basal 1-HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Basal2- HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Basal1- HER2+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}	Basal2- HER+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)				
No. of patients	89 (58.6)	12 (7.9)	12 (7.9)	39 (25.7)				
Age, years, mean \pm SD	58.2 \pm 16.4	57.83 \pm 14.0	68.33 \pm 15.3	56.67 \pm 14.2	0.935 ^{*1}	0.034 ^{*1}	0.739 ^{*1}	0.035 ^{*1}
Tumor size								
T1	34 (38.2)	3 (25.0)	0 (0.0)	13 (33.3)	0.483 / 0.360 ^{*2}	0.003 / 0.002 ^{*2}	0.849 / 0.849 ^{*2}	0.022 / 0.048 ^{*2}
T2	41 (46.1)	5 (41.7)	5 (41.7)	17 (43.6)				
T3+T4	6 (6.7)	3 (25.0)	5 (41.7)	7 (17.9)				
Inflammatory	5 (5.6)	1 (8.3)	1 (8.3)	2 (5.1)				
Unknown	3 (3.4)	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)				
Node status								
Negative	42 (47.2)	2 (16.7)	5 (41.7)	19 (48.7)	0.092 / 0.036 ^{*2}	0.515 / 0.531 ^{*2}	0.091 / 0.091 ^{*2}	0.311 / 1.000 ^{*2}
Positive	43 (48.3)	10 (83.3)	6 (50.0)	20 (51.3)				
Unknown	4 (4.5)	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)				
Tumor grade								
1	3 (3.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.6)	0.847 / 1.000 ^{*2}	0.656 / 1.000 ^{*2}	1.000 / 1.000 ^{*2}	0.453 / 1.000 ^{*2}
2	25 (28.1)	3 (25.0)	2 (16.7)	8 (20.5)				
3	43 (48.3)	8 (66.7)	6 (50.6)	25 (64.1)				
Unknown	18 (20.2)	1 (8.3)	4 (33.3)	5 (12.8)				
Adjuvant trastuzumab								
No	40 (44.9)	4 (33.3)	9 (75.0)	20 (51.3)	0.414 / 0.366 ^{*2}	0.207 / 0.104 ^{*2*b}	0.420 / 0.212 ^{*2*b}	0.413 / 0.313 ^{*2}
Yes	42 (47.2)	8 (66.7)	3 (25.0)	17 (43.6)				
Unknown	7 (7.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
Adjuvant chemotherapy								
No	21 (23.6)	1 (8.3)	3 (25.0)	8 (20.5)	0.271 / 0.291 ^{*2}	0.587 / 1.000 ^{*2}	0.448 / 0.412 ^{*2}	0.744 / 1.000 ^{*2}
Yes	57 (64.0)	11 (91.7)	9 (75.0)	27 (69.2)				
Unknown	11 (12.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (10.3)				
Adjuvant hormone therapy								
No	7 (7.9)	9 (75.0)	12 (100.0)	37 (94.4)	0.031 / 0.027 ^{*2}	<0.001 / <0.001 ^{*2*b}	0.078 / 0.078 ^{*2}	1.000 / 1.000 ^{*2}
Yes	71 (79.8)	3 (25.0)	0 (0.0)	2 (5.1)				
Unknown	11 (12.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				

(Continued)

Characteristic	Luminal-HER2+	Basal 1-HER2+	Basal 2-HER2+	HER2+	Basal 1-HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Basal2-HER2+ vs others <i>P</i> value ^{*a}	Basal1-HER2+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}	Basal2-HER2+ vs HER2+ <i>P</i> value ^{*a}
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)				
First clinically relevant event								
Local recurrence	1 (1.1)	1 (8.3)	1 (8.3)	1 (2.6)	0.539 / 0.451 ^{*2}	<0.001 / <0.001 ^{*2*b}	0.800 / 0.911 ^{*2}	0.012 / 0.008 ^{*2}
Distant metastasis	11 (12.4)	2 (16.7)	5 (41.7)	7 (18.4)				
Contralateral breast cancer	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (16.7)	0 (0.0)				
Second primary tumor	5 (5.6)	0 (0.0)	1 (8.3)	2 (5.3)				
Not occurred	58 (65.2)	7 (58.3)	2 (16.7)	24 (63.2)				
Unknown	8 (9.0)	1 (8.3)	0 (0.0)	1 (2.6)				
Death from other causes	6 (6.7)	1 (8.3)	1 (8.3)	3 (7.9)				
First metastases site								
Not occurred	79 (88.8)	9 (75.0)	8 (66.7)	33 (84.6)	0.155	0.073	0.566	0.231
Visceral	3 (3.4)	0 (0.0)	2 (16.7)	1 (2.6)				
No visceral	4 (4.5)	1 (8.3)	1 (8.3)	3 (7.7)				
Both	3 (3.4)	2 (16.7)	1 (8.3)	2 (5.1)				

^{*2} excludes unknown category

^{*1} Parametric test: Independent two-sample Student's *t* test

^{*a} Fisher's exact test

^{*b} Chi-square test

Overall survival (OS)

The 5-year Kaplan-Meier estimate of OS was 69% for patients with basal-HER2+ tumors, as compared with 82% for patients with luminal-HER2+ and 78% for HER2+ tumors (Figure 2). No statistical differences were found in 5-year estimated OS between patients with luminal-HER2+ tumors and those with HER2+ tumors. Upon stratification of basal-HER2+ to underlying CK5/6 expression, the 5-year Kaplan-Meier estimate of OS was 54% for patients with basal 2-HER2+ tumors (Figure 2), whereas the estimate of OS in patients with basal 1-HER2+ tumors (82%) was not statistically different to CK-negative (luminal-HER2+ and HER2+) HER2+ patients.

We utilized Cox's proportional-hazards regression model to assess OS (Table 3). Univariate analysis revealed that the presence of the basal-like phenotype was a significant predictor of a worse 5-year OS (hazard ratio 2.36, 95% confidence interval 1.18–4.75; *P* = 0.0159). Upon stratification of basal CK5/6 expression pattern, univariate analysis revealed that a positive CK5/6 staining in $\geq 10\%$ of the HER2+ breast cancer tissue sections (but not a positive CK5/6 < 10%) predicted a significantly worse prognosis in terms of 5-year OS (hazard ratio 4.07,

95% confidence interval 1.88–8.79; *P* < 0.001). Neither ER nor nodal statuses were statistically significant prognostic factors of 5-year OS. When variables correlating with univariate survival at *p* < 0.20 were later included in multivariate Cox regression analysis (Table 3), the basal-like phenotype lost its independent value for predicting OS. In multivariate analysis, only age at diagnosis and tumor size remained independent predictors of OS.

Disease-free survival (DFS)

The 5-year Kaplan-Meier estimate of DFS was 52% for patients with basal-HER2+ tumors, as compared with 77% for patients with luminal-HER2+, and 68% for HER2+ tumors (Figure 3). No statistical differences were found in 5-year estimated DFS between patients with luminal-HER2+ tumors and patients with HER2+. Notably, upon stratification of basal-HER2+ to underlying CK5/6 expression pattern, the 5-year Kaplan-Meier estimate of DFS was as low as 27% for patients with basal 2-HER2+ tumors (Figure 3), whereas the estimate of DFS in patients with basal 1-HER2+ tumors (75%) was not statistically different to those with basal CK-negative (luminal-HER2+ and HER2+) HER2+ patients.

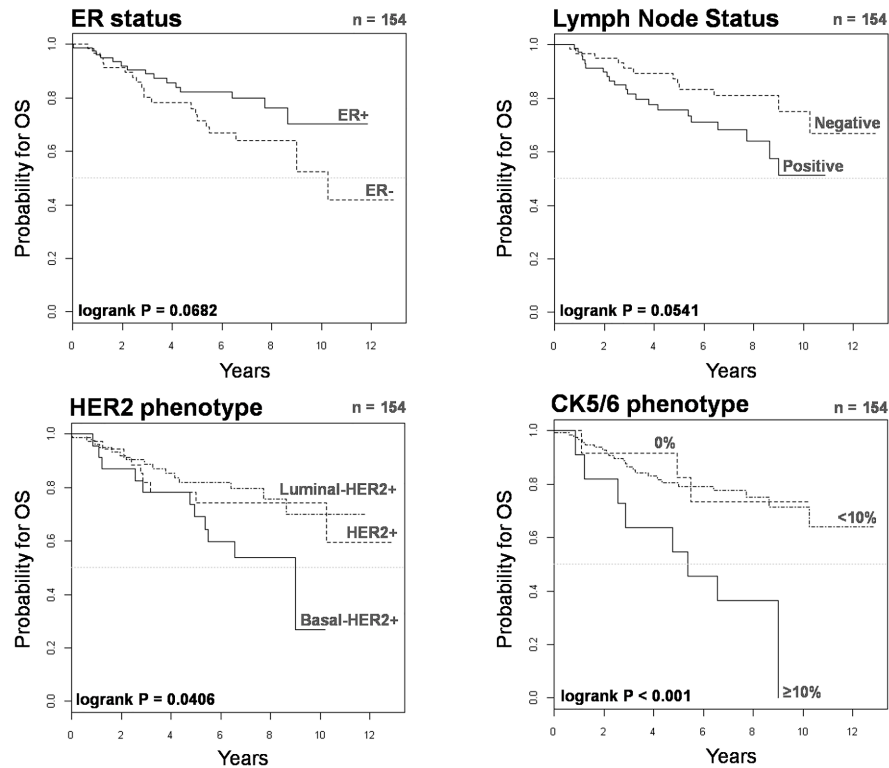


Figure 2: Kaplan-Meier OS curves of HER2+ patients stratified by ER status, lymph node status, HER2 phenotype, and CK5/6 phenotype.

Table 3: Cox regression analysis of factors predicting OS

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis ^{*1}	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
Age (continuous)	1.07 (1.04–1.10)	<0.001	1.06 (1.03–1.09)	<0.001
Tumor size				
T1	1		1	
T2	2.24 (0.81–6.25)	0.122	1.87 (0.66–5.32)	0.239
T3+T4	7.84 (2.68–22.88)	<0.001	5.75 (1.92–17.24)	0.002
Inflammatory	5.09 (1.19–21.69)	0.028	5.51 (1.29–23.60)	0.022
Lymph Node status				
Negative	1			
Positive	2.01 (0.97–4.14)	0.059		
Tumor grade				
1+2	1			
3	1.61 (0.68–3.81)	0.279		
ER status				
Negative	1			
Positive	0.54 (0.28–1.06)	0.072		

(Continued)

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis ^{*1}	
	Hazard ratio	<i>P</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
HER2+ phenotype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.25 (0.54–2.86)	0.600		
Basal-HER2+	2.55 (1.19–5.46)	0.016		
Basal phenotype				
Absent	1			
Present	2.36 (1.18–4.75)	0.0159		
CK5/6 phenotype				
0%	1			
< 10%	1.05 (0.31–3.49)	0.942		
≥ 10%	4.07 (1.88–8.79)	<0.001		
HER2+ Subtype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.25 (0.54–2.86)	0.599		
Basal 1-HER2+ (< 10%)	1.13 (0.33–3.91)	0.849		
Basal 2-HER2+ (≥ 10%)	4.39 (1.91–10.05)	<0.001		
Adjuvant trastuzumab				
No	1			
Yes	0.87 (0.43–1.80)	0.714		
Adjuvant chemotherapy				
No	1			
Yes	0.82 (0.38–1.78)	0.615		
Adjuvant hormone therapy				
No	1			
Yes	0.37 (0.18–0.77)	0.007		

*1 proportional hazard assumption for the Cox model has been checked

We utilized Cox's proportional-hazards regression model to assess DFS (Table 4). Univariate analysis revealed that the presence of the basal-like phenotype was a significant predictor of a worse 5-year DFS (hazard ratio 2.05, 95% confidence interval 1.04–4.04; $P = 0.037$). Upon stratification of basal CK5/6 expression pattern, univariate analysis revealed that a positive CK5/6 staining in $\geq 10\%$ of the HER2+ breast cancer tissue sections (but not a positive CK5/6 < 10%) predicted a significantly worse 5-year DFS (hazard ratio 4.17, 95% confidence interval 1.96–8.98; $P < 0.001$). Neither ER nor nodal statuses were statistically significant prognostic factors of 5-year DFS. Importantly, when variables correlating with univariate survival at $p < 0.20$ were later included

in multivariate Cox regression analysis (Table 4), the presence of the basal 2-HER2+ phenotype (i.e., a positive CK5/6 staining in more than 10% of the HER2+ breast cancer tissue sections) retained its independent value for predicting a worse outcome in terms of DFS (hazard ratio 2.44, 95% confidence interval 1.05–5.67; $P = 0.037$). In multivariate analysis, tumor size also remained an independent predictor of a worse DFS.

Time to treatment failure (TTF)

We investigated the prognostic significance of the basal-HER2+ phenotype in 104 HER2+ patients treated with either chemotherapy-only or trastuzumab-based

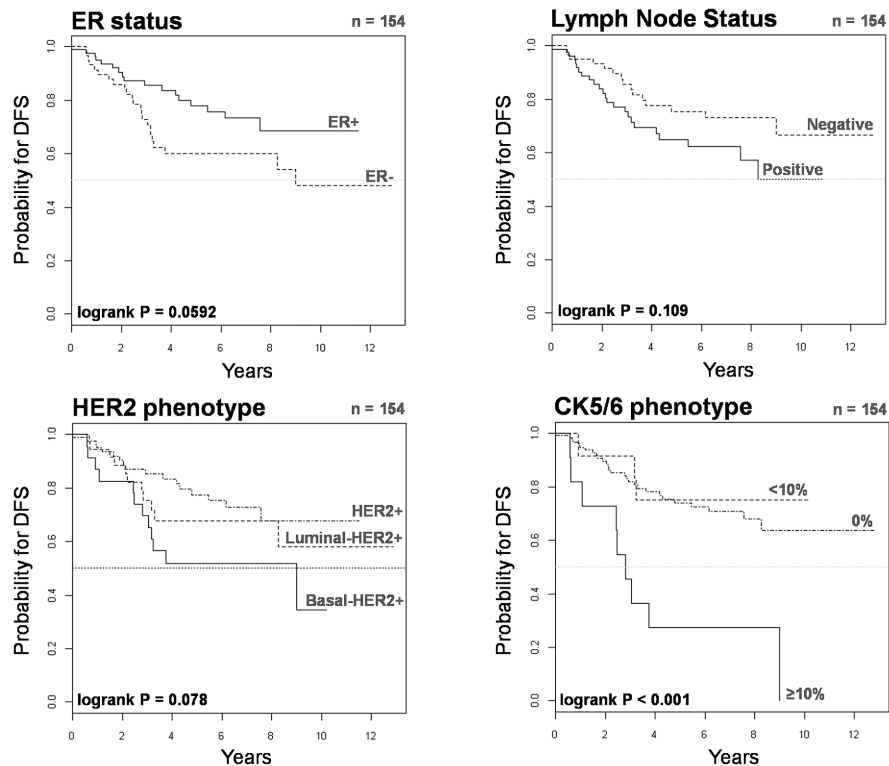


Figure 3: Kaplan-Meier DFS curves of HER2+ patients stratified by ER status, lymph node status, HER2 phenotype, and CK5/6 phenotype.

Table 4: Cox regression analysis of factors predicting DFS

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis *1	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
Age (continuous)	1.02 (1.00–1.04)	0.115		
Tumor size				
T1	1		1	
T2	3.38 (1.27–9.02)	0.015	3.05 (1.13–8.23)	0.028
T3+T4	7.74 (2.64–22.71)	<0.001	6.41 (2.05–20.05)	0.001
Inflammatory	5.21 (1.23–22.00)	0.025	5.17 (1.21–21.98)	0.026
Node status				
Negative	1			
Positive	1.69 (0.88–3.23)	0.113		
Tumor grade				
1+2	1			
3	1.01 (0.48–2.10)	0.989		
ER status				
Negative	1			
Positive	0.55 (0.29–1.03)	0.063		

(Continued)

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis *1	
	Hazard ratio	<i>P</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
HER2+ phenotype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.37 (0.64–2.93)	0.416		
Basal-HER2+	2.29 (1.10–4.82)	0.028		
Basal phenotype				
Absent	1			
Present	2.05 (1.04–4.04)	0.037		
CK5/6 phenotype				
0%	1	1		
< 10%	0.81 (0.25–2.68)	0.734	0.60 (0.18–2.02)	0.409
≥ 10%	4.17 (1.96–8.87)	<0.001	2.44 (1.05–5.67)	0.037
HER2+ Subtype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.37 (0.64–2.93)	0.415		
Basal 1-HER2+ (< 10%)	0.91 (0.27–3.11)	0.880		
Basal 2-HER2+ (≥ 10%)	4.67 (2.08–10.51)	<0.001		
Adjuvant trastuzumab				
No	1			
Yes	0.98 (0.51–1.87)	0.953		
Adjuvant chemotherapy				
No	1			
Yes	0.82 (0.40–1.70)	0.590		
Adjuvant hormone therapy				
No	1			
Yes	0.60 (0.32–1.13)	0.111		

*1 proportional hazard assumption for the Cox model has been checked

adjuvant ($n = 67$, 64%)/neoadjuvant ($n = 37$, 36%) chemotherapy. We utilized Cox's proportional-hazards regression model to assess whether the basal-HER2+ might constitute a predictor of a worse course in terms of time to treatment failure (TTF) (Table 5). Univariate analysis revealed that tumor size, node status and the presence of a basal-like phenotype predicted a significantly worsened TTF (Figure 4). Upon stratification of basal CK5/6 expression pattern, univariate analysis revealed that a positive CK5/6 staining in $\geq 10\%$ of the HER2+ breast cancer tissue sections (but not a positive CK5/6 < 10%) was a significant predictor of worse outcome in terms of TTF (hazard ratio 5.45, 95% confidence interval

2.07–14.35; $P < 0.001$). Remarkably, after accounting for prognostic variables correlating with univariate survival at $p < 0.20$ (Table 5), tumor size and the presence of the basal 2-HER2+ phenotype (i.e., a positive CK5/6 staining in $\geq 10\%$ of the HER2+ breast cancer tissue sections) retained their independent value for predicting a worse prognosis in terms of TTF (hazard ratio 3.66; 95% confidence interval 1.24–10.78; $P = 0.019$) in multivariate Cox regression analysis.

We finally assessed the prognostic significance of the basal-HER2+ phenotype in 69 HER2+ patients treated with trastuzumab-based adjuvant ($n = 42$, 61%)/neoadjuvant ($n = 27$, 39%) therapy (Table 6). Upon

Table 5: Cox regression analysis of factors predicting TTF

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis ^{*1}	
	Hazard ratio	<i>P</i>	Hazard ratio	<i>P</i>
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
Age (continuous)	1.01 (0.98–1.05)	0.384		
Tumor size				
T1	1		1	
T2	7.74 (1.01–59.55)	0.049	6.73 (0.87–52.25)	0.068
T3+T4	19.80 (2.38–165.03)	0.006	11.64 (1.29–104.96)	0.029
Inflammatory	16.03 (1.65–155.62)	0.017	15.09 (1.54–147.66)	0.020
Node status				
Negative	1			
Positive	3.42 (1.16–10.08)	0.026		
Tumor grade				
1+2	1			
3	0.90 (0.31–2.55)	0.836		
ER status				
Negative	1			
Positive	0.56 (0.24–1.29)	0.170		
HER2+ phenotype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.11 (0.37–3.33)	0.848		
Basal-HER2+	2.72 (1.08–6.87)	0.034		
Basal phenotype				
Absent	1			
Present	2.63 (1.14–6.07)	0.024		
CK5/6 phenotype				
0%	1		1	
< 10%	1.30 (0.37–4.52)	0.684	1.26 (0.36–4.47)	0.717
≥ 10%	5.45 (2.07–14.35)	<0.001	3.66 (1.24–10.78)	0.019
HER2+ Subtype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.11 (0.37–3.32)	0.855		
Basal 1-HER2+ (< 10%)	1.34 (0.36–4.97)	0.659		
Basal 2-HER2+ (≥ 10%)	5.64 (1.99–15.99)	0.001		
Treatment				
Only Chemotherapy	1			
Trastuzumab + Chemotherapy	0.99 (0.43–2.30)	0.989		

^{*1} proportional hazard assumption for the Cox model has been checked

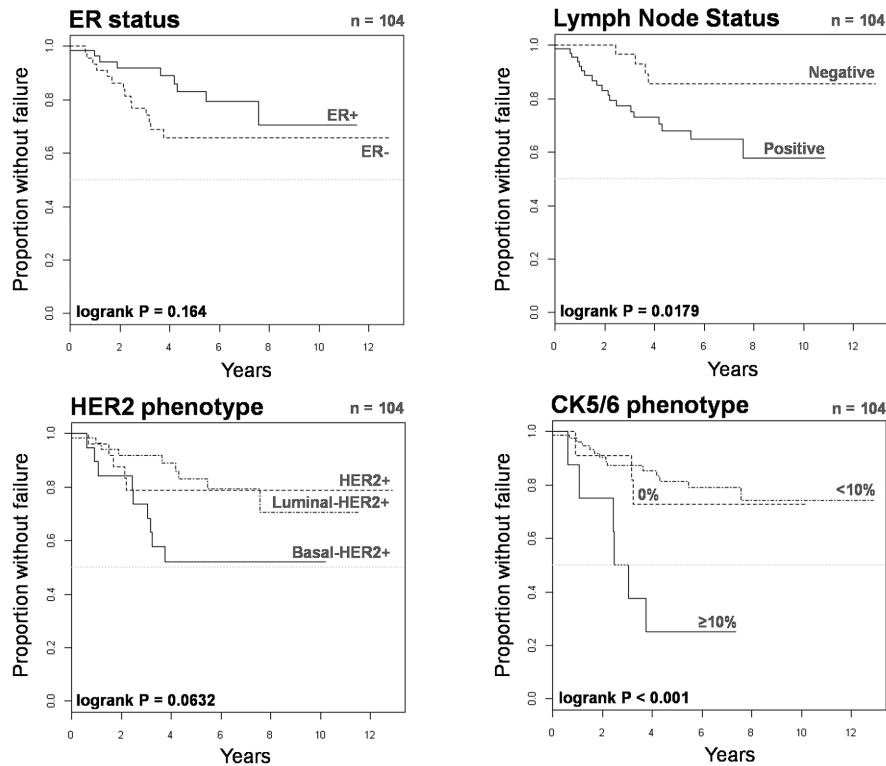


Figure 4: Kaplan-Meier TTF curves of HER2+ patients treated with chemotherapy only or trastuzumab-based therapy when stratified by ER status, lymph node status, HER2 phenotype, and CK5/6 phenotype.

Table 6: Cox regression analysis of factors predicting time to trastuzumab failure

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis ^{*1}	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
Age (continuous)	1.03 (0.98–1.08)	0.264		
Tumor size				
T1	1			
T2	4.72 (0.57–39.34)	0.152		
T3+T4	14.19 (1.43–140.77)	0.024		
Inflammatory	7.05 (0.63–78.70)	0.113		
Node status				
Negative	–	–		
Positive	–	–		
Tumor grade				
1+2	1			
3	1.27 (0.33–4.92)	0.731		
ER status				
Negative	1			
Positive	0.65 (0.22–1.95)	0.447		

(Continued)

Characteristics	Univariate analysis		Multivariate analysis ^{*1}	
	Hazard ratio	P	Hazard ratio	P
	(95% confidence interval)		(95% confidence interval)	
HER2+ phenotype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.29 (0.32–5.18)	0.724		
Basal-HER2+	1.79 (0.49–6.46)	0.376		
Basal phenotype				
Absent	1			
Present	1.66 (0.50–5.54)	0.408		
CK5/6 phenotype				
0%	1		1	
< 10%	0.89 (0.18–4.43)	0.888	0.89 (0.18–4.43)	0.888
≥ 10%	6.80 (1.39–33.36)	0.018	6.80 (1.39–33.36)	0.018
HER2+ Subtype				
Luminal-HER2+	1			
HER2+	1.34 (0.33–5.43)	0.684		
Basal 1-HER2+ (< 10%)	0.96 (0.19–4.97)	0.966		
Basal 2-HER2+ (≥ 10%)	7.49 (1.41–39.70)	0.018		

^{*1} proportional hazard assumption for the Cox model has been checked

stratification of basal CK5/6 expression pattern, univariate analysis confirmed that a positive CK5/6 staining in ≥ 10% of the HER2+ breast cancer tissue sections (but not a positive CK5/6 < 10%) was a significant predictor of worse outcome in terms of TTF in trastuzumab-treated patients (hazard ratio 7.49, 95% confidence interval 1.41–39.70; $P = 0.018$). More importantly, a positive CK5/6 staining in ≥ 10% of the HER2+ breast cancer tissue sections remained the sole independent factor predicting a worse outcome of trastuzumab-treated patients in terms of TTF in multivariate Cox regression analysis (hazard ratio 6.80, 95% confidence interval 1.39–33.36). Kaplan-Meier estimates of TTF confirmed that patients with basal 2-HER2+ tumors did not benefit from adding trastuzumab to chemotherapy (Figure 5).

DISCUSSION

Currently available gene expression signatures cannot identify HER2+ subgroups of good- and poor-responders to trastuzumab. In an ambitious attempt to address the need for a predictor of trastuzumab benefit, Pogue-Geile *et al.* [8] developed an eight-gene model able to stratify HER2+ tumors into a discontinuous distribution of patients within 3 different subsets of “extraordinary”, “moderate”, and “no apparent” benefit from trastuzumab.

This complexity makes the establishment of optimal cutoffs nearly impossible and the validation of the eight-gene classifier, if applied arbitrarily, could lead to misclassification of HER2+ patients and thus inappropriate treatment recommendations [22]. Using molecular profiling to investigate the variable prognosis and response to therapy of HER2+ tumors, Staaf *et al.* [23] identified a 158-gene HER2-derived prognostic predictor (HDPP) that improved the stratification of good and poor prognosis for both OS and distant metastasis-free survival in both the HER2-enriched molecular subtype and the basal-like subtype, which are assumed to be mutually exclusive breast cancer entities. When applied to a small HER2+ group of patients preoperatively treated with trastuzumab, the HDPP signature correlated with the occurrence of trastuzumab resistance. Although the sample size was insufficient to form any conclusion, it should be noted that when formerly analyzing this data set, Harris *et al.* [9] posited that “*HER2-overexpressing tumors with a basal-like phenotype*” were more likely to be intrinsically resistant to pre-operative trastuzumab. Here, we present evidence that immunohistochemical reclassification of HER2+ breast cancer tumors by basal CK5/6 expression might be sufficient to significantly improve prognosis and trastuzumab-based therapeutic planning.

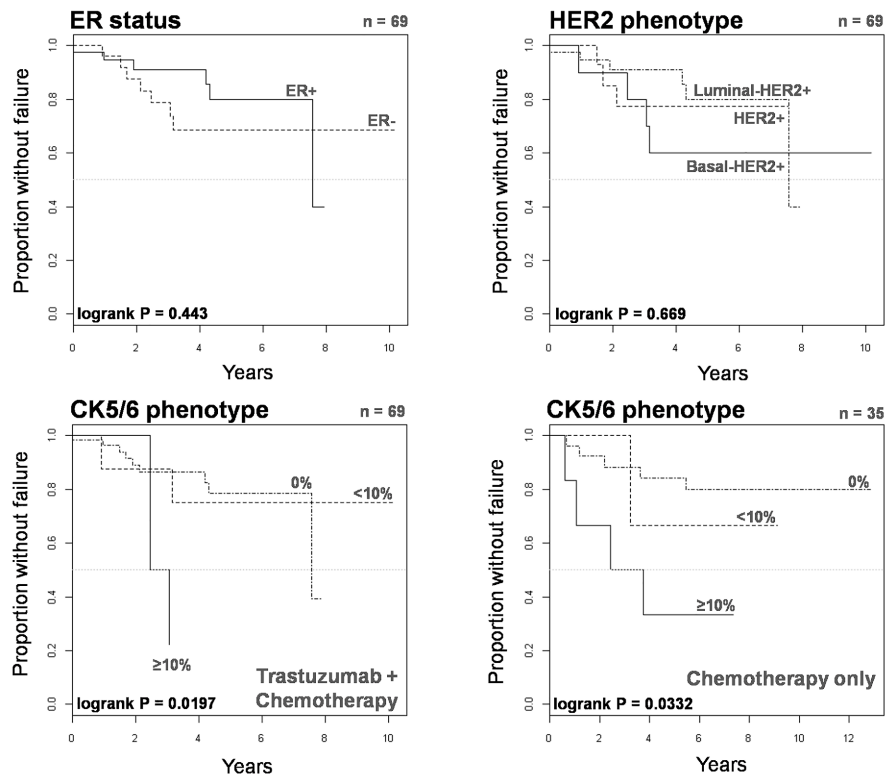


Figure 5: Kaplan-Meier TTF curves of HER2+ patients treated with trastuzumab-based therapy when stratified by ER status, HER2 phenotype, and CK5/6 phenotype.

Previous morpho-immunohistologic studies [15–19] have shown that a subgroup of HER2+ tumors consistently demonstrate several features classically ascribed to basal-like tumors, including poor differentiation, high-grade, geographic necrosis, pushing margins of invasion, syncytial arrangement of tumor cells, ribbon- or festoon-like, squamous metaplasia, stromal lymphocytic infiltrates, high mitotic index, and p53 positivity. Importantly, these basal-HER2+ breast carcinomas show immunoreactivity for the basal epithelium cytokeratin marker CK5/6, which at times appears as a uniform or almost uniform positive staining that fully mimics the pattern of pure basal-like breast carcinomas, but often displays checkerboard-type intratumoral heterogeneity. Here we confirm that the basal-HER2+ phenotype defined by the immunohistochemical expression of basal CK5/6 is associated with aggressive disease and adversely impacts survival in HER2+ breast cancer patients. In our series, there were no statistically significant differences in OS and DFS between patients with ER-positive luminal-HER2+ tumors and ER-negative HER2+ tumors. However, the basal-HER2+ phenotype was significantly associated with inferior OS by univariate analysis and, after accounting for strong prognostic variables such as tumor size at diagnosis in stepwise multivariate analysis, the presence of the basal-HER2+ phenotype, but not ER status, also predicted significantly worsened DFS when a positive CK5/6 staining in $\geq 10\%$

of the HER2+ breast cancer tissue sections was registered as a diagnostically relevant positive reaction.

Our findings might not only have important implications for prognosis, but also for therapy. The simple and specific CK5/6 fingerprint using a 10% cutoff allows the re-classification of HER2+ tumors into a sub-class of basal 1-HER2+ tumors (<10% of cells showing positive CK5/6 staining), which appear to be prognostically indistinguishable from HER2+ tumors, and a sub-class of clinically aggressive basal 2-HER2+ tumors ($\geq 10\%$ of cells showing positive CK5/6 staining) which will likely be unresponsive to trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapy. While acknowledging that our study is small and exploratory and the data on adjuvant/neoadjuvant trastuzumab are limited in size (approximately 45% of HER2+ patients) and maturity (median follow-up is approximately 4 years for patients treated with adjuvant trastuzumab), the fact that the use of adjuvant/neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy did not greatly differ between patients with HER2+ and basal 2-HER2+ tumors together with the strong association between the basal 2-HER2+ phenotype and worsened survival and shorter time to trastuzumab-based treatment failure, strongly suggest that immunohistochemical identification of the basal 2-HER2+ phenotype may be used as a predictive marker of primary refractoriness to trastuzumab. Accordingly, the co-expression of well-known basal-like molecular features,

including expression of the anti-apoptotic protein survivin, the dynamic emergence of the CD44⁺CD24^{-low} breast cancer stem cell (CSC) immunophenotype, or the occurrence of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenomena, occurs exclusively in HER2⁺ breast cancer cells exhibiting primary resistance to trastuzumab [10, 19, 24–30].

The *a priori* characterization of distinct biological HER2⁺ breast cancer subgroups associated with poorer prognosis and resistance to trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapy using DNA microarrays is not currently feasible for large-scale clinical applications. In this setting, immunohistochemical staining of basal CK5/6 can be a useful surrogate to predict inferior survival and poorer responses to trastuzumab-based therapy. In our hands, a CK5/6-based fingerprint using a 10% positivity cutoff allows the rapid re-classification of HER2⁺ tumors in a manner that improves prognosis and therapeutic planning in a sub-class of patients with clinically aggressive basal-HER2⁺ tumors who are unlikely to benefit from trastuzumab-based adjuvant therapy (Figure 6). It is tempting to suggest that CK5/6-defined basal-HER2⁺ tumors might be viewed as an immunohistochemical algorithm, analogous to EMT and CSC-like gene signatures and likely contributes to the poor outcomes in basal-HER2⁺ tumors [31–36]. Although larger retrospective studies should be conducted to unequivocally determine whether basal-HER2⁺ tumors are differentially enriched with cells combining EMT/CSC phenotypes, it is noteworthy that the sole re-classification of ER-/HER2⁺ tumors by the expression of the core EMT transcription factors SNAI2 (SLUG) and TWIST [37] using the on-line Kaplan-Meier plotter (<http://kmplot.com/>) [38, 39], was sufficient to predict a significantly inferior relapse free survival (RFS) and distant metastasis free survival (DMFS) in the EMT-like/HER2⁺ patient cohort (Figure 7).

There is an urgent need to generate a more definitive taxonomy of HER2⁺ breast carcinomas as well as molecular forecasting signatures to be validated prospectively and in samples from trastuzumab-based clinical trials. Our current findings lend support to forthcoming prospective studies aimed to validate the concept that identification of CK5/6-positive immunophenotypes within HER2⁺ breast carcinomas may be a rapid and accurate method for identifying intrinsic subgroups of biologically aggressive tumors likely to display resistance to trastuzumab *ab initio* in women diagnosed with HER2⁺ cancer.

METHODS

Study patients

The prospectively maintained breast cancer database at the Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta in Girona, Spain was queried to identify patients diagnosed

with HER2-overexpressing primary breast cancer between June 2000 and February 2014. The study was limited to the most common breast cancer histology, i.e., invasive ductal cancer, to allow for more accurate prognostication. The investigators irreversibly anonymized (stripped of any link to the original patient) all the tissues and existing data in such a manner that subjects cannot be identified, directly or through identifiers linked to the subjects.

Immunohistochemistry (IHC) and classification

Primary tumor size according to pathological analysis was classified according to the Seventh Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. A board-certified specialty-trained breast pathologist (E. L. B.) reviewed immunohistochemical (ER, HER2) stainings from 154 consecutive patients with HER2-overexpressing primary invasive ductal breast cancer. Approximately 30% of the study cohort was previously checked for receptor expression, which was undertaken as an internal quality control measure to confirm that the ER and HER2 status of patients at the time of performance of this study was in agreement with that initially rendered at the time of diagnosis. No noticeable differences were encountered when ER and HER2 IHC staining was scored using criteria from published guidelines. The cutoff for ER immunoreactivity was 10% positive tumor nuclei irrespective of intensity. HER2 expression status was considered positive if immunostaining was scored as 3+ (i.e., strongly positive in > 10% of cancer cells by IHC) according to HercepTest criteria. For an equivocal result of HER2 2+ (i.e., moderately positive in > 10% of cancer cells by IHC), HER2 expression status was considered positive if fluorescent *in situ* hybridization (FISH) assay revealed a HER2:chromosome-17 amplification ratio of > 2.2.

Paraffin-embedded tissue sections from HER2⁺ tumors were immunostained with CK5/6 (clone D5/16B4, Dako; 1:50 dilution) antibody. Antigen retrieval was performed using Tris-EDTA pH 9 for 30 minutes. Analysis was carried out by a board-certified pathologist (E. L. B.), who scored the basal CK5/6 staining on a scale of 0–2: 0, no staining; 1, < 10% of cells showing positive staining; and 2, ≥ 10% of cells showing positive. A CK5/6 score greater than 0 originally defined a positive basal phenotype. Tumors were then classified as luminal/HER2⁺ subtype (ER positive and basal CK5/6 negative), HER2⁺ subtype (ER negative and basal CK5/6 negative), and basal-HER2⁺ subtype (ER negative and basal CK5/6 positive) (Figure 1).

The current study is reported according to the Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK). Laboratory personnel who were blinded to clinical data and outcomes performed all IHC assays. Assay results were interpreted and scored by a pathologist (E. L. B.) who remained blinded to clinical data.

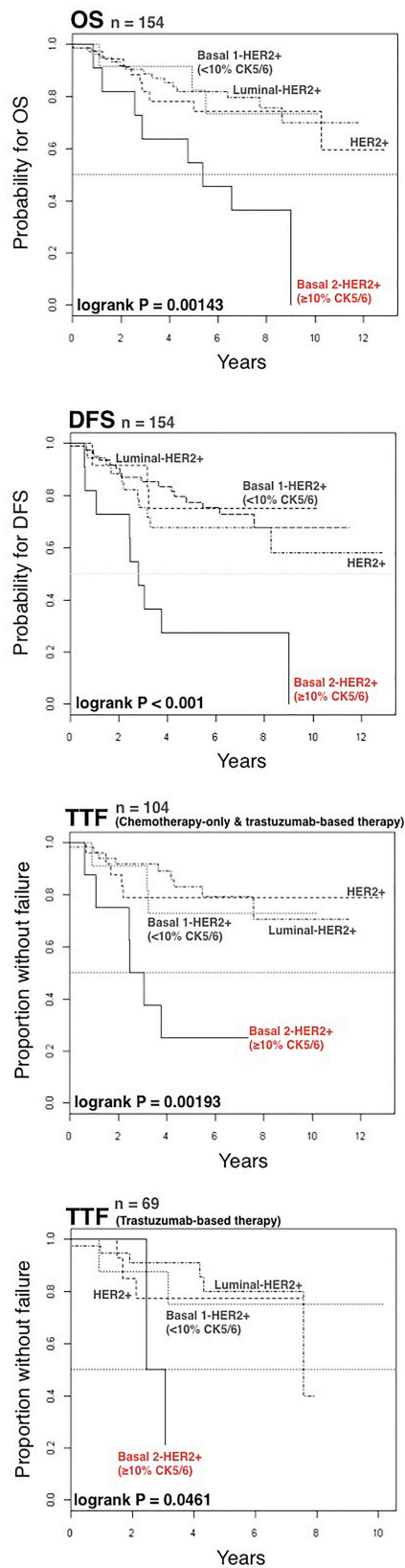


Figure 6: Kaplan-Meier OS, DFS, and TTF curves for patients with luminal-HER2+, HER2+, basal 1-HER2+ (<10% CK5/6), and basal 2-HER2+ (≥10% CK5/6) tumors as defined by immunohistochemical analysis (Figure 1).

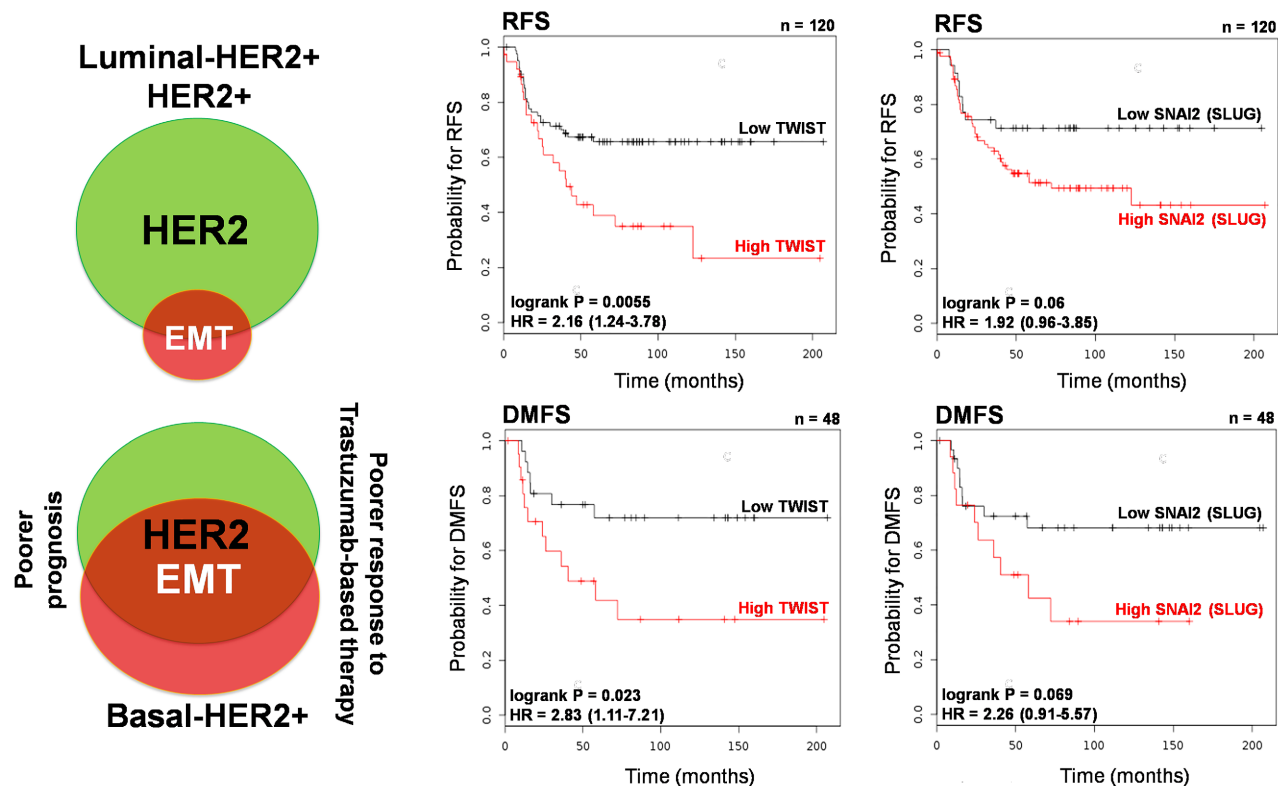


Figure 7: Kaplan-Meier RFS and DMFS curves of HER2+ patients stratified by low/high TWIST and low/high SNAI2 (SLUG) gene expression.

Statistical analysis

All statistical data analyses were performed using IBM SPSS version 21.0 (IBM Corp. 2012) and R software environment (<http://www.r-project.org/>). Data collected included date of birth, date of diagnosis, tumor size, tumor grade, lymph node status, receipt of adjuvant therapy (hormone, trastuzumab, and chemotherapy), site and date of recurrent disease, and date of death. Proportions observed among categorical variables were compared using the chi-squared test or Fisher's exact test. The Mann-Whitney U test was used to test for differences in continuous variables. Survival functions were estimated for disease-free survival and overall survival using the product-limit method of Kaplan and Meier. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis to the date of death. Disease-free survival (DFS) was calculated from the date of initial diagnosis to the date of recurrence or death, whichever came first. Patients not experiencing an event were considered censored at the date of last contact. Time to treatment failure (TTF) was calculated from the date of therapy initiation to the time of first evidence of failure, i.e., disease progression, recurrence or death. Inference on survival functions among subgroups was based on the log-rank test for the

equality of the survival functions. Cox's proportional-hazards regression model was used to identify statistically significant predictors of OS, DFS, and TTF and the proportional hazard assumption was validated. In such models, the covariate function is proportional to the hazard or mortality and, therefore, positive coefficients indicate a shorter survival with increasing value of the covariate. P values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2012-38914), Plan Nacional de I+D+I, Spain and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris I de Recerca (AGAUR) (Grant 2014 SGR229), Departament d'Economia I Coneixement, Catalonia, Spain.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353:1673–1684.
- Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE Jr, Martino S, Rastogi P, Gralow J, Swain SM, Winer EP, Colon-Otero G, Davidson NE, et al. Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014; 32:3744–3752.
- Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Reinholz MM, Tenner KS, Davidson NE, Gralow J, Harris LN, Kutteh LA, Hillman DW, Jenkins RB, Chen B. Predictability of adjuvant trastuzumab benefit in N9831 patients using the ASCO/CAP HER2-positivity criteria. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104:159–162.
- Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Chen B, Geiger XJ, Jenkins RB, Lingle WL, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Kutteh LA, Sledge GW, Harris LN, et al. Impact of PTEN protein expression on benefit from adjuvant trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 trial. *J Clin Oncol*. 2013; 31:2115–2122.
- Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, Martino S, Sledge GW, Harris LN, Gralow JR, Dueck AC, Ketterling RP, Ingle JN, et al. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28:4307–4315.
- Moreno-Aspitia A, Hillman DW, Dyar SH, Tenner KS, Gralow J, Kaufman PA, Davidson NE, Lafky JM, Reinholz MM, Lingle WL, Kutteh LA, Carney WP, Dueck AC, et al. Soluble human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels in patients with HER2-positive breast cancer receiving chemotherapy with or without trastuzumab: results from North Central Cancer Treatment Group adjuvant trial N9831. *Cancer*. 2013; 119:2675–2682.
- Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358:1409–1411.
- Pogue-Geile KL, Kim C, Jeong JH, Tanaka N, Bandos H, Gavin PG, Fumagalli D, Goldstein LC, Sneige N, Burandt E, Taniyama Y, Bohn OL, Lee A, et al. Predicting degree of benefit from adjuvant trastuzumab in NSABP trial B-31. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105:1782–1788.
- Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, Ryan PD, Come SE, Burstein HJ, Lesnikowski BA, Kamma M, Friedman PN, Gelman R, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:1198–1207.
- Martin-Castillo B, Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Moreno JM, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martín ÁG López-Bonet E, Menendez JA. Basal/HER2 breast carcinomas: integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2013; 12:225–245.
- Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747–752.
- Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98:10869–10874.
- Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:8418–8423.
- Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:10393–10398.
- Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adélaïde J, Geneix J, Bachelart L, Finetti P, Koki A, Hermitte F, Hassoun J, Debono S, et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene*. 2004; 23:2564–2575.
- Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Bergh J, Isola J. Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:4185–4191.
- Liu H, Fan Q, Zhang Z, Li X, Yu H, Meng F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Hum Pathol*. 2008; 39:167–174.
- Bhargava R, Beriwal S, Striebel JM, Dabbs DJ. Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expression of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010; 18:113–118.
- Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del Barco S, Bernado L, Brunet J, López-Bonet E, Menendez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo

- resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol*. 2010; 37:669–678.
20. Bagaria SP, Ray PS, Wang J, Kropcho L, Chung A, Sim MS, Shamonki JM, Martino S, Cui X, Giuliano AE. Prognostic value of basal phenotype in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19:935–940.
 21. Kaufmann O, Fietze E, Mengers J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2001; 116:823–830.
 22. Krop IE, Burstein HJ. Trastuzumab: qui bono?. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105:1772–1775.
 23. Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, et al. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 2010; 28:1813–1820.
 24. Oliveras-Ferraro C, Corominas-Faja B, Cufí S, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Iglesias JM, López-Bonet E, Martín AG, Menéndez JA. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2012; 11:4020–4032.
 25. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Torres-García VZ, Sauri-Nadal T, Barco SD, López-Bonet E, Brunet J, Martin-Castillo B, Menéndez JA. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 407:412–419.
 26. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, López-Bonet E, Brunet J, Menéndez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos) CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 397:27–33.
 27. Cufí S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Dorca J, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Menéndez JA. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget*. 2012; 3:395–398.
 28. Yakirevich E1, Samkari A, Holloway MP, Lu S, Singh K, Yu J, Fenton Altura RA, : Total Survivin and acetylated Survivin correlate with distinct molecular subtypes of breast cancer. *Hum Pathol*. (MA: 2012)43865873
 29. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*. 2008; 10:R53.
 30. Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res*. 2008; 68:989–997.
 31. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*. 2009; 69:4116–4124.
 32. Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010; 15:253–260.
 33. Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, et al. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:15449–15454.
 34. May CD, Sphyris N, Evans KW, Werden SJ, Guo W, Mani SA. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: a dangerously dynamic duo in breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2011; 13:202.
 35. Herschkowitz JI, Zhao W, Zhang M, Usary J, Murrow G, Edwards D, Knezevic J, Greene SB, Darr D, Troester MA, Hilsenbeck SG, Medina D, Perou CM, et al. Comparative oncogenomics identifies breast tumors enriched in functional tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:2778–2783.
 36. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports*. 2013; 2:78–91.
 37. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res*. 2011; 71:245–254.
 38. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients, *Breast Cancer Res Treatment*. 2010; 123:725–731.
 39. Györfy B, Lanczky A, Szallasi Z. Implementing an online tool for genome-wide validation of survival-associated biomarkers in ovarian-cancer using microarray data of 1287 patients, *Endocrine-Related Cancer*. 2012; 19:197–208.

Estudio #2

**Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin):
Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas**

ONCOTARGET-2015

[DOI: 10.18632/oncotarget.6094](https://doi.org/10.18632/oncotarget.6094)

Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas

Begoña Martin-Castillo^{1,2,3}, Eugeni Lopez-Bonet⁴, Elisabet Cuyàs^{2,5}, Gemma Viñas^{2,6}, Sonia Pernas⁷, Joan Dorca^{2,6} and Javier A. Menendez^{2,5}

¹ Unit of Clinical Research, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain

² Molecular Oncology Group, Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI), Girona, Catalonia, Spain

³ Department of Biochemistry and Molecular Biology II, Faculty of Pharmacy, Complutense University, Madrid, Spain

⁴ Department of Anatomical Pathology, Dr. Josep Trueta Hospital of Girona, Girona, Catalonia, Spain

⁵ ProCURE (Program Against Cancer Therapeutic Resistance), Metabolism and Cancer Group, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain

⁶ Department of Medical Oncology, Catalan Institute of Oncology, Girona, Catalonia, Spain

⁷ Department of Medical Oncology, Breast Unit, Catalan Institute of Oncology-Hospital Universitari de Bellvitge-Bellvitge Research Institute (IDIBELL), L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain

Correspondence to: Javier A. Menendez, **email:** jmenendez@iconcologia.net

Keywords: HER2, cancer stem cells, basal-like, cytokeratins, trastuzumab

Received: August 01, 2015

Accepted: September 24, 2015

Published: October 12, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Clinically HER2+ (cHER2+) breast cancer (BC) can no longer be considered a single BC disease entity in terms of trastuzumab responsiveness. Here we propose a framework for predicting the response of cHER2+ to trastuzumab that integrates the molecular distinctions of intrinsic BC subtypes with recent knowledge on cancer stem cell (CSC) biology. First, we consider that two interchangeable populations of epithelial-like, aldehyde dehydrogenase (ALDH)-expressing and mesenchymal-like, CD44⁺CD24^{-/low} CSCs can be found in significantly different proportions across all intrinsic BC subtypes. Second, we overlap all the intrinsic subtypes across cHER2+ BC to obtain a continuum of mixed phenotypes in which one extreme exhibits a high identity with ALDH+ CSCs and the other extreme exhibits a high preponderance of CD44⁺CD24^{-/low} CSCs. The differential enrichment of trastuzumab-responsive ALDH+ CSCs *versus* trastuzumab-refractory CD44⁺CD24^{-/low} CSCs can explain both the clinical behavior and the primary efficacy of trastuzumab in each molecular subtype of cHER2+ (i.e., HER2-enriched/cHER2+, luminal A/cHER2+, luminal B/cHER2+, basal/cHER2+, and claudin-low/cHER2+). The intrinsic plasticity determining the epigenetic ability of cHER2+ tumors to switch between epithelial and mesenchymal CSC states will vary across the continuum of mixed phenotypes, thus dictating their intratumoral heterogeneity and, hence, their evolutionary response to trastuzumab. Because CD44⁺CD24^{-/low} mesenchymal-like CSCs distinctively possess a highly endocytic activity, the otherwise irrelevant HER2 can open the door to a type of "Trojan horse" approach by employing antibody-drug conjugates such as T-DM1, which will allow a rapid and CSC-targeted delivery of cytotoxic drugs to therapeutically manage trastuzumab-unresponsive basal/cHER2+ BC. Contrary to the current dichotomous model used clinically, our model proposes that a reclassification of cHER2+ tumors based on the spectrum of molecular BC subtypes might inform on their CSC-determined sensitivity to trastuzumab, thus providing a better delineation of the predictive value of cHER2+ in BC by incorporating CSCs-driven intra-tumor heterogeneity into clinical decisions.

During the past decade, several pathological and immunohistochemical (IHC) sub-classifications have been proposed to better characterize the extensive and heterogeneous molecular features of hormone receptor-positive and triple-negative breast cancer (BC) at the clinical level [1-9]. This type of classification, however, has not been extended to clinically HER2+ (cHER2+) BC. To date, cHER2+ BC, as exclusively determined by immunohistochemistry of HER2 protein overexpression and/or fluorescence *in situ* hybridization of HER2 gene amplification, has been largely considered a single disease entity [10-14]. Presumably, this is due to the apparent dominant role of the HER2 receptor itself on the biology and clinical behavior of HER2+ cells, as well as on the almost universal use of the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin) to therapeutically manage patients with cHER2+ tumors. Interestingly, the importance of HER2 to distinguish a unique BC subtype might be rather low when compared to the magnitude of the BC genome expression as a whole. In other words, the distinct and intrinsic molecular subtypes (luminal A, luminal B, HER2-enriched [HER2e], basal-like, and claudin-low) appear to retain their biological function and, more importantly, their clinical outcome, regardless of the cHER2+ status [15]. However, although the prognostic value of cHER2+ appears to disappear when the molecular subtype is taken into consideration, little is known about how the co-presence of a given molecular subtype might provide independent predictive information for trastuzumab benefit beyond cHER2+ status.

THE BASAL-HER2+ SUBTYPE CONFERS THE POOREST BC PROGNOSIS AMONG CHER2+ BCS

We are beginning to appreciate that *de novo* (primary) resistance to trastuzumab might occur inside the framework of a mixed BC subtype, in which HER2 overexpression/amplification takes place within a basal-like molecular background [16-23]. While it is not yet clear which IHC markers (e.g., CK5, CK5/6, CK14, CK17 and/or EGFR), alone or in combination, provide the greatest accuracy in defining basal-like BC, Chung *et al.* [23] have recently described that 37% of 97 patients with stage 1-3 HER2+ BC expressed at least one basal marker. When considering the expression of individual markers, the authors identified 15% of CK5/6+/HER2+, 8% of CK14+/HER2+, and 34% of EGFR+/HER2+. A previous study from the same group reported a basal-HER2+ phenotype in 9% of 131 HER2+ tumors when considering the expression of either CK5/6 or CK14 [19]. In a large series of 713 consecutive hormone receptor-negative invasive BC, Liu *et al.* [17] reported 8% of basal-HER2+ cases expressing HER2 and any of the basal markers CK5/6, CK14, or EGFR. Using a consecutive series of 152 HER2+ primary invasive

ductal BC, we recently reported 16% of cHER2+ cases presenting a basal-HER2+ phenotype established solely on expression of the basal marker CK5/6 [22]. Beyond IHC-based sub-classification studies, Prat *et al.* [15] used molecular data derived from DNA, RNA, and protein to determine intrinsic BC subtypes in more than 1,700 patients not treated with trastuzumab. This study confirmed that cHER2+ BC had a 14.1% frequency of the intrinsic basal-like subtype, while a similar likelihood (14.4%) of cHER2+ occurred in intrinsic basal-like subtypes. Interestingly, within cHER2+ tumors, HER2 gene and protein expression was significantly higher not only in the HER2-enriched subtype but also in the basal-like subtype when compared to luminal BC subtypes. All of these studies similarly concluded that basal-HER2+ patients have the worst disease-free and overall survival among all the HER2+ subtypes (i.e., the cHER2+ status does not add independent prognostic value to the intrinsic BC subtype), which was even poorer than that of highly aggressive basal-like BC [17].

AMONG CHER2+ BCS, A BASAL-LIKE PHENOTYPE PREDICTS THE POOREST PRIMARYRESPONSE TOTRASTUZUMAB

Beyond confirming the notion that the occurrence of a basal-HER2+ phenotype can delineate a subgroup of intrinsically aggressive cHER2+ BC, a recent study by our group was the first to reveal that basal-HER2+ patients might not benefit from the addition of trastuzumab on top of chemotherapy [22]. Accordingly, in the sub-cohort of HER2+ patients ($n = 69$) treated with trastuzumab-based adjuvant/neoadjuvant therapy, the basal-HER2+ phenotype was found to be the sole independent prognostic marker for a significantly inferior time to treatment failure in multivariate analysis. Chung *et al.* [23] have recently confirmed that CK5/6 and EGFR expression are predictive of worse prognosis in HER2+ BC patients treated with trastuzumab. Given the known association between the basal-like subtype with stronger responses to chemotherapy compared with other molecular subtypes, the higher recurrence rates in basal-HER2+ patients receiving adjuvant chemotherapy and trastuzumab should be viewed as the ability of the basal protein expression to dictate *de novo* refractoriness to trastuzumab in cHER2+ patients. Although Chung *et al.* [23] acknowledge that they failed to identify a significant predictive threshold for CK5/6 expression, our study established that a simple CK5/6-based fingerprint using a 10% positivity cutoff might be used as a strong predictive marker of primary refractoriness to trastuzumab [22]. These findings build on the pioneering discoveries in 2007 by Harrys *et al.* [16], who demonstrated that a particular HER2+ tumor phenotype overexpressing genes associated with the basal-like phenotype, including higher expression of basal cytokeratins, exhibited intrinsic resistance to pre-operative

trastuzumab and vinorelbine.

THE BASAL-HER2+ MIXED SUBTYPE ACCUMULATES MULTIPLE CSC-RELATED MECHANISMS OF RESISTANCE TO TRASTUZUMAB

There is an ever-expanding body of literature documenting possible mechanisms of escape from trastuzumab that share many of the same markers and signaling pathways implicated in the biology of drug-resistant cancer stem cells (CSCs) [24-44]. Given that enrichment for CSC-like features is a well-known molecular hallmark of highly aggressive basal-like BC [45-57], it is reasonable to propose a causal link between the presence of basal markers (e.g., CK5/6), an augmented CSC activity, and primary resistance to trastuzumab in basal-HER2+ disease. Indeed, earlier studies from our group and others have repeatedly described that basal-HER2+ cells exhibiting *de novo* resistance to trastuzumab distinctively amass a majority of the known mechanisms for trastuzumab resistance [18, 20, 21, 23, 30, 33, 44], which are not mutually exclusive (Figure 1). The key mediators of these mechanisms are closely linked to CSCs [25].

While confirmation of these *in vitro* findings in

clinical specimens will be required to unambiguously demonstrate the role of CSCs in clinical resistance to trastuzumab, we should also acknowledge that trastuzumab efficacy appears to rely, at least in part, on its ability to directly target and inhibit CSCs in HER2+ tumors [58-65]. Moreover, HER2 protein itself appears to be a key driver of CSCs in BC even in the absence of HER2 overexpression/amplification [60, 64, 65], which might explain the unexpected clinical efficacy of adjuvant trastuzumab in cHER2-negative BC [66, 67]. Therefore, if the molecular basis for the clinical efficacy of trastuzumab is *via* a CSC targeting-dependent process, the most direct manner to resolve this scenario is the counterintuitive proposal of the *a priori* occurrence of trastuzumab-resistant HER2+ CSCs exclusively in basal-HER2+ BC, but not in other HER2+ phenotypes. That is, “*not all HER2+ CSCs are born equal*”, because basal-HER2+ tumors continue to grow not only when challenged with trastuzumab, but also when treated with other anti-HER therapies (e.g., the dual EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib [30, 43, 68]). Alternatively, when considering the plasticity of CSC-like cellular states in BC [56], perhaps we need to paraphrase Orwell to rather consider that “*all HER2+ CSCs are equal, but some HER2+ CSCs are more equal than others*”. We here propose a framework for predicting the response of cHER2+ to trastuzumab that integrates the molecular

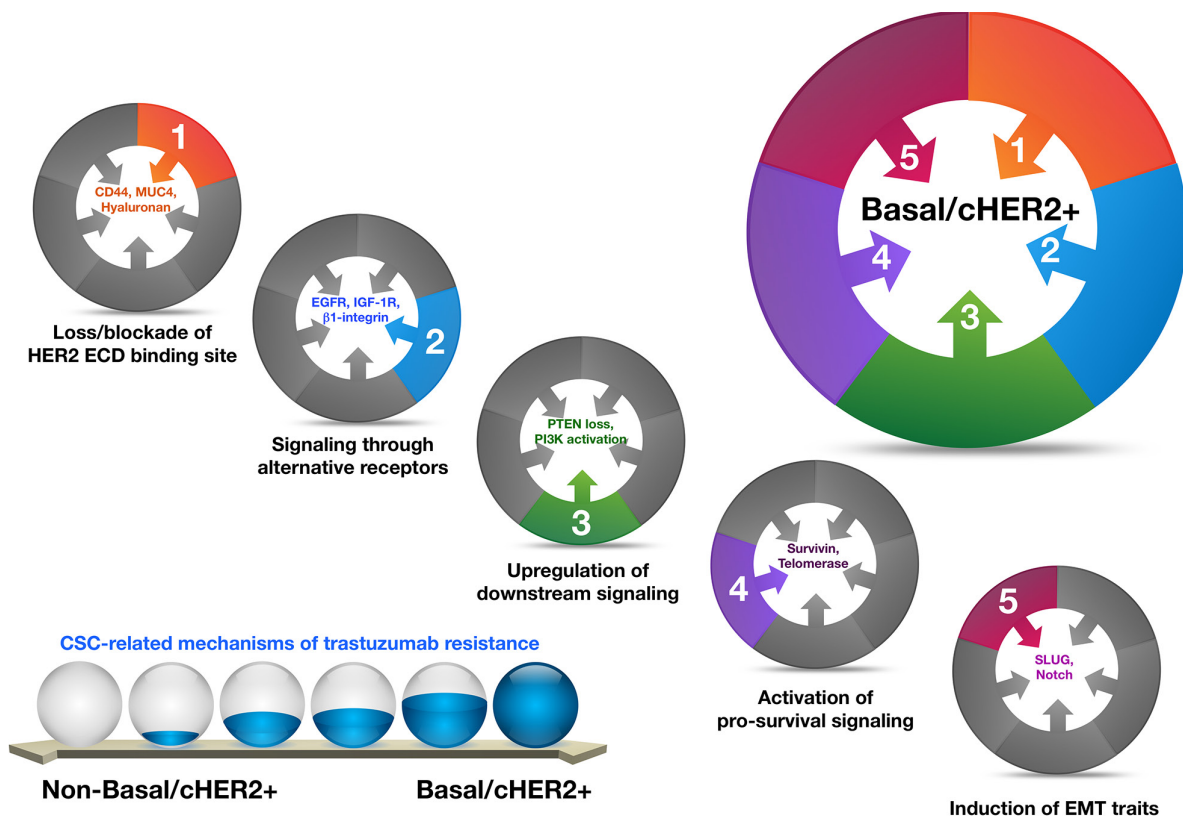


Figure 1: Basal-HER2+ BC cells accumulate a majority of the known mechanisms for trastuzumab resistance, which are not mutually exclusive, and whose key mediators are closely linked to CSCs.

distinctions of intrinsic BC subtypes with the most recently acquired data on CSC biology in BC.

INTRINSIC MOLECULAR SUBTYPES, CSCS STATES AND HER2+ BC: RETHINKING THE PROGNOSTIC-PREDICTIVEVALUEOFHER2+TUMORS

Breast CSCs appear to exist in two different, but reversible and therefore interchangeable, epithelial (E)- and mesenchymal (M)-like states [56]; the first state characterized by the expression of aldehyde dehydrogenase (ALDH) [58, 69-73], and the second state characterized by the CD44+CD24-/low immunophenotype [74-76]. Importantly, while these distinct CSC populations can be found across all the molecular/intrinsic BC subtypes, their proportion varies significantly. Accordingly, the number of ALDH-expressing E-CSCs is significantly higher in HER2-enriched (HER2e) and luminal B BC, while basal-like and claudin-low BC are

highly enriched in CD44+CD24-/low M-CSCs. Moreover, the gene expression profiles of E-CSCs resemble those of luminal stem cells, whereas the profiles of M-CSCs resemble those of basal stem cells in normal breast [56, 77-79]. Given this knowledge and the understanding that different BC molecular subtypes are characterized by distinct mutational portraits [80], a unique combination of genetic and likely also microenvironmental factors will ultimately contribute to the predominance of each CSC phenotype in a given cHER2+ tumor type.

We propose that when overlapping each molecular BC subtype across the continuum of cHER2+, where one extreme is the complete absence of CD44+CD24-/low M-CSCs in HER2-enriched/cHER2+ tumors and the other extreme is a high preponderance of CD44+CD24-/low M-CSCs in basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ tumors, the differential enrichment of ALDH-expressing versus CD44+CD24-/low CSCs might explain both the clinical behavior and the primary efficacy of trastuzumab in each mixed cHER2+ subtype (Figure 2). On the one hand, the enrichment of ALDH-expressing E-CSCs

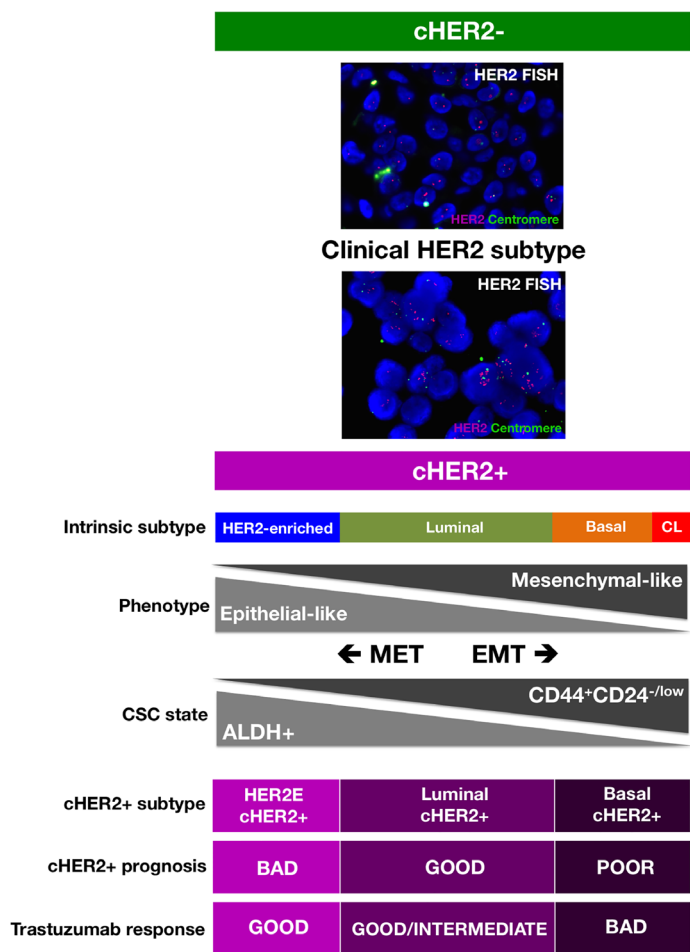


Figure 2: A new framewok for predicting the response of cHER2+ to trastuzumab that integrates the molecular distinctions of intrinsic BC subtypes with the most recent knowledge of CSC biology. (CL: Claudin-low; HER2E: HER2-enriched; MET: Mesenchymal-Epithelial Transition; EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition).

in HER2e/cHER2+ and luminal B/cHER2+ subtypes might contribute to the known poor clinical outcome of BC co-overexpressing ALDH and HER2 [81, 82]. Simultaneously, given that efficacy of trastuzumab appears to relate directly to its ability to drastically reduce the fraction of ALDH-positive cells in HER2+ BC cell populations (i.e., CSC populations defined by high ALDH express the highest HER2 levels and remain exquisitely sensitive to trastuzumab treatment, whereas HER2+ BC cell populations exhibiting primary resistance to trastuzumab maintain an intact population of ALDH+ cells following trastuzumab treatment [58]), HER2e/cHER2+ and luminal B/cHER2+ BC will be the mixed phenotype which will benefit greatest from trastuzumab (Figure 2). If the highest preponderance of ALDH-expressing E-CSCs occurs in the HER2e/cHER2+ and luminal B/cHER2+ BC subtypes and not in the luminal A/cHER2+ subtype, this model could also explain why a minority of patients with cHER2+ BC have an excellent prognosis even in the absence of treatment [83, 84]. On the other hand, the enrichment of CD44⁺CD24^{-low} M-CSCs may contribute to the highly aggressive clinical behavior of the basal/cHER2+ phenotype since CD44⁺CD24^{-low} cells will endow this subtype with a mesenchymal-related enhancement of BC progression [85-87]. Simultaneously, since the enrichment of mesenchymal traits results in a highly refractory response to the anti-tumor actions of trastuzumab [20, 21, 30, 33], the basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ BC will be the phenotypes with less benefit from this treatment.

INTERCHANGEABLE EPITHELIAL/MESENCHYMAL CSC CELLULAR STATES AND TRASTUZUMAB RESISTANCE: PREDICTING THE CLINICAL BEHAVIOR OF cHER2+

Our current framework of CSC-driven primary efficacy of trastuzumab in cHER2+ also incorporates the idea that breast CSCs have an intrinsic plasticity allowing the transition between the epithelial-like (ALDH+) state and the mesenchymal-like (CD44⁺CD24^{-low}) state. These reversible transitions might endow cHER2+ tumors with a plastic capacity for tissue invasion, dissemination, and growth at metastatic sites, thus ultimately determining the prognosis of each mixed cHER2+ subtype. Alternatively, the ability of CSCs to transit from a trastuzumab-responsive epithelial-like state to a trastuzumab-refractory mesenchymal-like state might endow cHER2+ with a plastic degree of responsiveness to trastuzumab, thus ultimately determining the predictive value of each cHER2+ subtype. Once again, however, it should be noted that the degree of plasticity that enables CSCs (and non-CSC) to transit between these states should vary among each molecular subtype of cHER2+: cHER2+ BC of

luminal origin will be more refractory, but still capable, for loss of an epithelial-like state, whereas basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ BC will be inherently poised to gain a mesenchymal-like state. Indeed, our proposed model can readily accommodate the current available data regarding the occurrence of trastuzumab refractoriness driven by the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) phenomenon [20, 21, 34, 88-92].

JIMT-1 was the first commercial cell line established from a HER2+ patient with intrinsic resistance to trastuzumab, and is naturally enriched for a CD44⁺CD24^{-low} mesenchymal state. Interestingly, the subpopulation of trastuzumab-refractory basal/HER2+ JIMT-1 cells exhibiting CD44⁺CD24^{-low} M-CSC-like surface markers changes over time [30]. Whereas low-passage cultures contain ~10% of cells with the CD44⁺CD24^{-low} immunophenotype, late-passage JIMT-1 cultures accumulate ~80% of CD44⁺CD24^{-low} cells, thus exhibiting an almost perfect identity to the CD44⁺CD24^{-low}-enriched phenotype constitutively occurring in the commonly HER2-negative claudin-low subtype [90-92]. Resistance to trastuzumab (and lapatinib) has been shown to occur when HER2+ cells spontaneously switch from a luminal to a claudin-low phenotype following EMT [93]. The natural ability to acquire a trastuzumab-refractory EMT phenotype might however be higher in HER2+ cells lacking some key epithelial markers such as estrogen receptor and E-cadherin, and are therefore poised to acquire a new mesenchymal state. In contrast, HER2+ cells expressing high levels of markers typical of the luminal phenotype will maintain their trastuzumab-responsive epithelial-like phenotype. Thus, when contemplating a continuum of epithelial-like and mesenchymal-like CSC states throughout the overlapping molecular BC subtypes in cHER2+, it becomes obvious that the EMT phenomenon is a pivotal mechanism that, when activated, convergently drives primary and secondary resistance to HER2-targeted therapies (for a more detailed explanation of how the EMT phenomenon impacts intra-tumor heterogeneity and trastuzumab efficacy in cHER2+ BC, see BOX1).

It is noteworthy that the *de novo* enrichment of EMT traits, which appears to be a major determinant of primary resistance to trastuzumab in basal/cHER2+ BC cells, and the spontaneous acquisition of EMT traits, which may constitute a major determinant of acquired resistance to trastuzumab in HER2e and luminal (A and B)/cHER2+ BC cells, both converge on a significant decrease in HER2 expression. Our work showed that the spontaneous enrichment of the CD44⁺/CD24^{-low} CSC-mesenchymal phenotype in basal/HER2+ cells was coincidental with a global decrease in HER2 expression [30]. Using luminal-HER2+ BC cells, Lesniak *et al.* [93] reported that the spontaneous conversion of trastuzumab-responsive luminal/HER2+ cells to a trastuzumab-refractory CD44⁺/CD24^{-low} phenotype through EMT was accompanied by a strong down-regulation of HER2. These findings may

have major clinical implications when considering the discordance rates for HER2 expression between matching and metastatic tumors [94], and following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy [95, 96]. Notably, cHER2+ patients whose metastatic disease has converted to HER2-negative have a worse overall prognosis [97], while cHER2+ patients whose residual disease following treatment with neoadjuvant trastuzumab abrogates HER2 overexpression have a significantly poorer recurrence-free survival (RFS) [98]. If a change in HER2 status merely reflects the heterogeneity of HER2 expression within the tumor (i.e., trastuzumab treatment eliminates HER2-overexpressing clones leaving only HER2-negative tumor cells upon completion of therapy), it then follows that trastuzumab should have an equal effect on those tumors achieving a pathological complete response and those tumors becoming HER2-negative. However, the fact that the RFS is significantly better for cHER2+ patients with tumors that retain HER2 overexpression implies that negativization of HER2 is accompanied by an increased aggressiveness in residual disease. Basal/cHER2+ tumors rarely exhibit a uniformly positive basal cytokeratin expression, but instead show a partially-positive type (“baso-luminal” [99]) often displaying

a checkerboard-type intratumoral heterogeneity [18]. Therefore, an enrichment of clones or cell clusters with a high percentage of CSCs displaying a basal/mesenchymal phenotype and decreased HER2 expression might explain the poor response of basal/cHER2+ to trastuzumab, as well as the change in HER2 expression status (Figure 3). If a major determinant of trastuzumab resistance in luminal and HER2e/cHER2+ tumors is the *de novo* occurrence of EMT phenomena, leading to the appearance of mesenchymal clones or cell clusters with a CD44⁺/CD24^{-low}/HER2-low phenotype, the selection pressure of trastuzumab treatment will similarly lead to the emergence of trastuzumab-refractory mesenchymal-CSCs, as well as a shift in the HER2 status of the tumor (Figure 3, BOX1). Indeed, the plasticity between CSC types ultimately will result in significant challenges not only to the efficacy of trastuzumab itself but also to trastuzumab-based chemotherapy. EMT phenotypic shifts resulting in increased numbers of M-CSCs will increase the local recurrence capacity of a given cHER2+ subtype by decreasing proliferation and thus generally avoiding the activity of cytotoxic chemotherapeutic agents. By increasing the proportion of trastuzumab- and chemotherapy-refractory low-proliferative/quiescent

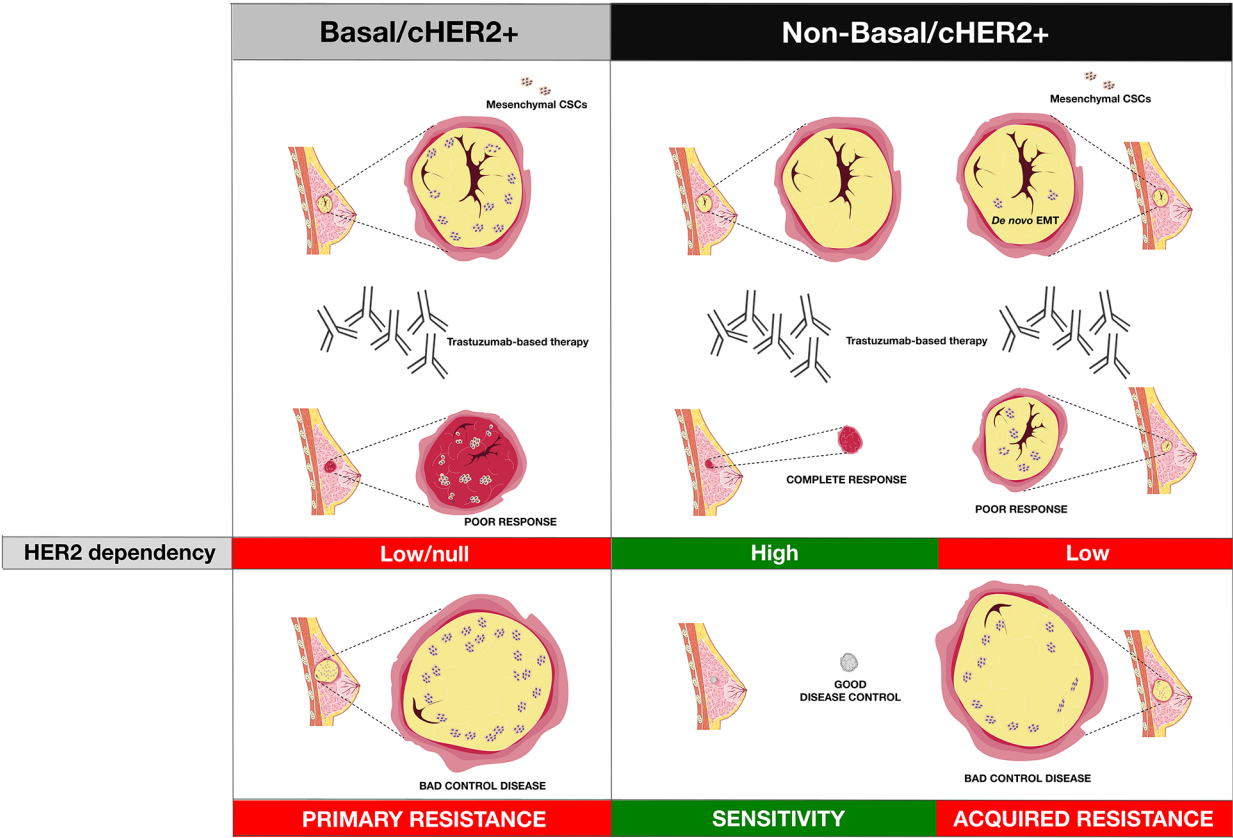


Figure 3: The intrinsic degree of plasticity determining the ability of cHER2+ BC to switch between epithelial and mesenchymal CSC states will vary across the continuum of mixed phenotypes, thus dictating their evolutionary response to trastuzumab.

M-CSCs cells at the invasive edge, a cHER2+ tumor belonging to a given molecular subtype would also augment its capacity of entering the circulation and forming micro-metastases at distant sites. Genetic diversity, epigenetic activation of signaling pathways, and the tumor microenvironment will influence, independently or simultaneously, the plastic capacity of M-CSCs to transitioning back to a proliferative state driven by E-CSCs after cessation of treatment, thus mediating local and metastatic tumor relapses over time (BOX 1).

Forthcoming clinical studies should clarify whether intratumoral heterogeneity in basal cytokeratins and/or conventional EMT markers can confirm a crucial role of HER2-negative M-CSCs in determining trastuzumab efficacy and patient survival in cHER2+ BC. Available *in vitro* data, however, appears to confirm that the degree of intrinsic plasticity to drive the trastuzumab-refractory CD44⁺/CD24^{-/low} mesenchymal CSC state may account for the *de novo* resistance to trastuzumab in basal/cHER2+ BC. Experiments in our laboratory have shown that trastuzumab-refractory basal/HER2+ JIMT-1 cells can be converted into trastuzumab-responsive cells by promoting the conversion of CD44⁺/CD24^{-/low} M-CSC-like states into CD24⁺ E-CSC-like CSC states [20]. Indeed, the depletion of SLUG, a critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer

[100], was sufficient to drastically reduce the percentage of cells with a trastuzumab-refractory CD44⁺/CD24^{-/low} immunophenotype. Moreover, this sensitized the original basal-HER2+ cell population by increasing the number of trastuzumab-responsive ALDH-expressing cells (unpublished observations). The fact that metformin-induced preferential killing of CD44⁺/CD24^{-/low} cells was similarly sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in basal/HER2+ xenografts *in vivo* [33], lends pharmacological support to the concept that the relative enrichment in CD44⁺/CD24^{-/low} M-CSCs is a/the key determinant of the *de novo* efficacy of trastuzumab. Accordingly, diverse molecular mechanisms leading to the reversal of the mesenchymal phenotype in HER2+ tumors (e.g., miR-200c-driven suppression of TGF- β signaling [101, 102]) have been found to efficiently counteract trastuzumab resistance and the invasion-metastasis cascade in cHER2+ BC.

CSC-DRIVEN EFFICACY OF TRASTUZUMAB AND THE RECLASSIFICATION OF CHER2+ BC: A THERAPEUTIC COROLLARY

Despite the undeniable improvements in treatment,

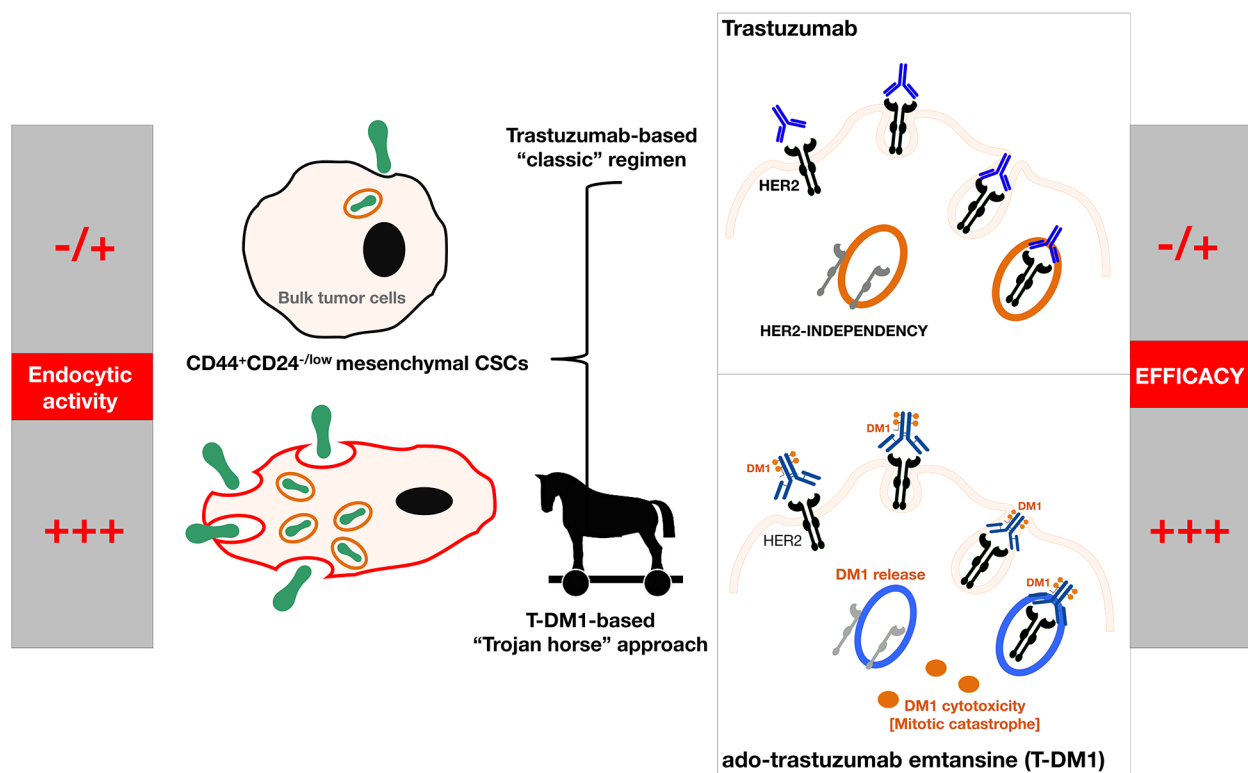


Figure 4: Because trastuzumab-refractory CD44⁺CD24^{-/low} mesenchymal-like CSCs distinctively possess a highly endocytic activity, the otherwise irrelevant HER2 in basal/cHER2+ can open the door to a "Trojan horse" type approach by employing antibody-drug conjugates such as T-DM1, which will allow a rapid and CSC-targeted delivery of cytotoxic drugs to therapeutically manage cHER2+ BC with primary resistance to trastuzumab.

many cHER2+ BC patients ultimately die because of disease progression. It is thus critical to increase success rates in the adjuvant/neoadjuvant setting. Unfortunately, no clear biomarkers have emerged as reliable predictors of primary resistance to trastuzumab. Although newer agents are under investigation and are expected to improve outcomes for early-stage patients in combination with trastuzumab-based adjuvant therapy, at the moment we cannot offer clinicians clear guidance on solutions that can be integrated in the daily clinical routine. Because the biologically-distinct intrinsic BC subtypes appear to retain their individual molecular characteristics and biological behavior regardless of cHER2+ status, prospective studies are needed to test the concept that the overlap

of each molecular BC subtype across the cHER2+ BC spectrum might generate an *a priori* prediction model of response to trastuzumab. In this framework, the known aggressiveness of the basal-like BC subtype confers not only worsened outcomes for patients with cHER2 BC, but also the poorest response to trastuzumab. Contrary to the current dichotomous clinical model (cHER2+ *versus* cHER2-), our model proposes that reclassification of cHER2+ tumors based on CSC-related markers might indirectly inform on their CSC-driven refractoriness to trastuzumab, thus providing a better delineation of the predictive value of cHER2+ in BC (BOX 1). Indeed, an equivalent overlapping of the intrinsic BC subtypes across the continuum of cHER2-negative BC can explain

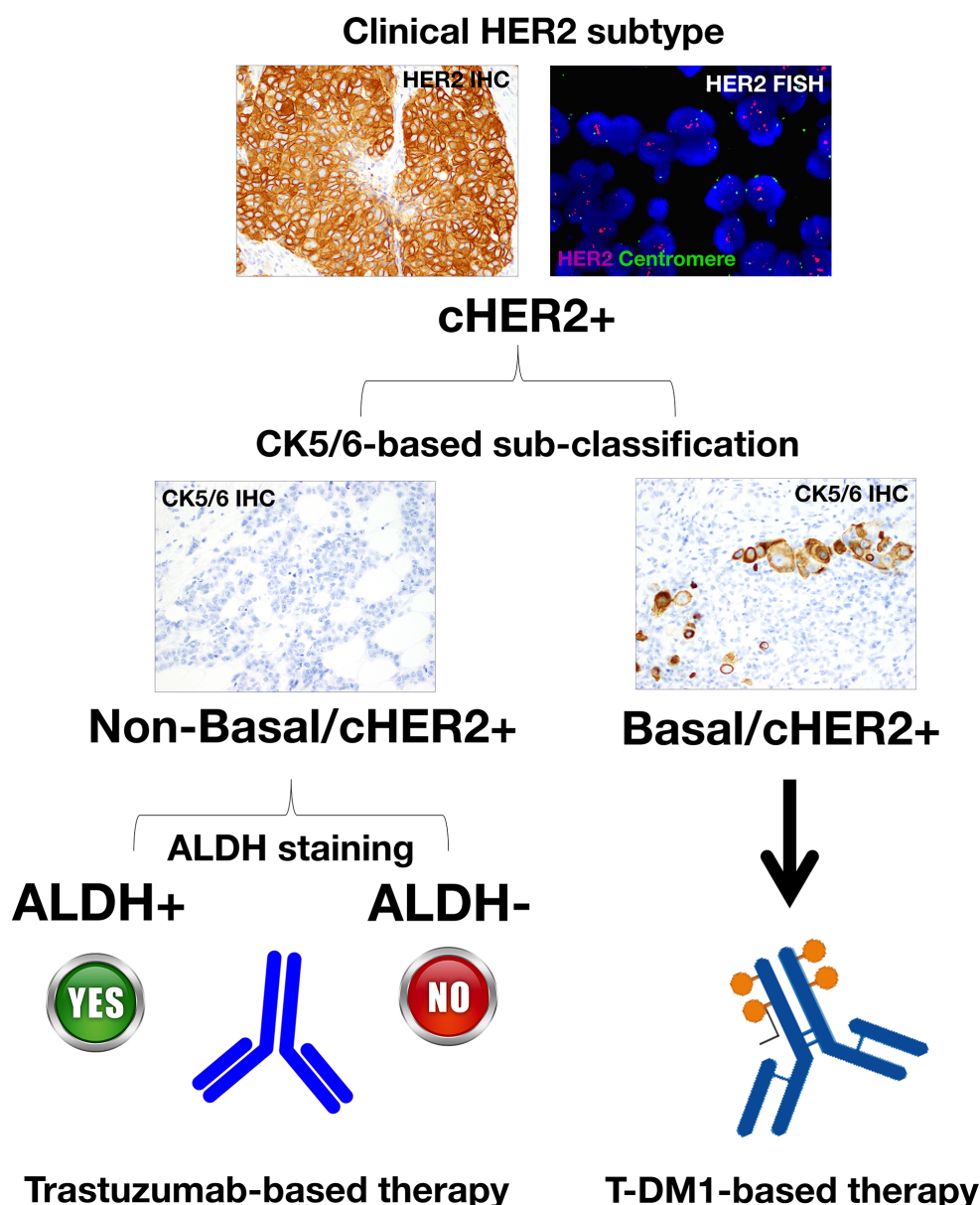


Figure 5: A reclassification of cHER2+ tumors based on basal (e.g., cytokeratin 5/6) and CSC-related markers (e.g., ALDH) might inform on their CSC-determined sensitivity to trastuzumab and T-DM1, thus providing a better delineation of the predictive value of cHER2+ in BC.

the apparently paradoxical activity of trastuzumab in HER2e/cHER2- and luminal/HER2- tumors [66, 67], which accumulate HER2-dependent (but not due to gene amplification) ALDH-overexpressing E-CSCs. This can also explain the inefficiency of trastuzumab in basal/cHER2- tumors, which accumulate HER2-independent CD44⁺/CD24^{-low} M-CSCs [64, 65]. Because only strongly ALDH-positive cells show a more aggressive phenotype typical of E-CSCs [103], it might be relevant to evaluate whether the stem cell biomarker ALDH could be associated with trastuzumab efficacy in a cut-off-dependent manner in cHER2+ *versus* cHER2- BC. Nevertheless, it is important to stress that at least two key questions need to be answered before a mixed molecular/clinical classification can be implemented to aid oncologists in the therapeutic management of HER2+ tumors.

First, it is important to address whether the plastic transition between trastuzumab-responsive epithelial-like CSC states and trastuzumab-refractory mesenchymal-like CSC states can similarly explain the efficacy of trastuzumab in the metastatic setting. Although Giordano *et al.* [104] reported that patients with HER2+ metastatic BC have circulating tumor cells (CTCs) undergoing EMT and enrichment for CSC features, additional studies are needed to determine whether EMT-CTCs [105-107] and CSCs have prognostic or predictive value in HER2+ metastatic BC treated with trastuzumab-based therapy. Interestingly, overexpression of the putative CSC biomarker beta1-integrin, a structural component of basal epithelial cells, is an independent negative prognostic factor for tumor progression of HER2+ metastatic BC treated with trastuzumab-based chemotherapy [108]. Beta1-integrin is constitutively overexpressed in basal/HER2+ BC cells with *de novo* resistance to trastuzumab [21, 109], whereas the expression of a heavily N-glycosylated variant of beta1-integrin is activated during the spontaneous conversion of trastuzumab-sensitive HER2+ luminal cells to a trastuzumab-unresponsive HER2- claudin-low phenotype. Our current framework therefore predicts that a primary basal/cHER2+ or claudin-low/cHER2+ phenotype would likely remain unchanged in metastatic disease, whereas one should expect a higher degree of phenotypic conversion during the metastatic evolution of primary luminal/cHER2+ phenotypes.

Second, a definition of potentially clinically actionable groupings of cHER2+ BC that improves prognosis and therapeutic planning, especially in the sub-class of basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ BC patients that are not likely to benefit from trastuzumab-based therapy, should be accompanied by alternative therapeutics able to eliminate the clinically-critical tumor cell population of trastuzumab-unresponsive CSC mesenchymal states. The ability of the anti-diabetic drug metformin to suppress self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant CSCs [33, 110,

111] is under evaluation in the METTEN study, a phase II, randomized, open-label, multicentric trial of neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab with or without metformin in women diagnosed with HER2-positive primary BC [112]. Interestingly, the new antibody-drug conjugate ado-trastuzumab emtansine (T-DM1, Kadcyla®), which consists of the potent chemotherapeutic DM1 (maytansinoid) coupled to trastuzumab, has been shown to potently and differentially target trastuzumab-refractory mesenchymal CSCs [113]. It appears that CD44⁺/CD24^{-low} cells display a highly endocytic activity, thereby rendering them particularly sensitive to antibody-drug conjugates such as T-DM1. Indeed, treatment with T-DM1 not only depleted pre-existing CD44⁺/CD24^{-low} cells at concentrations that failed to affect the bulk of tumor cells, but also prevented the EMT-mediated induction of CSC-like properties in differentiated tumor cells [113]. The unanticipated targeting of the mesenchymal state of CSCs by T-DM1 may indeed explain the efficacy of this recently approved antibody-drug conjugate against the outgrowth of trastuzumab-refractory basal/HER2+ BC cells xenotransplanted in animal models [114]. Specifically, because CD44⁺CD24^{-low} mesenchymal-like CSCs distinctively possess a highly endocytic activity, the otherwise irrelevant HER2 can open the door to a “Trojan horse” type approach through the employment of antibody-drug conjugates such as T-DM1, which will allow a rapid and CSC-targeted delivery of cytotoxic drugs to trastuzumab-unresponsive basal/cHER2+ BC (Figure 4).

The extension of BC subtypes in clinical settings such as triple-negative BC could lead to “orphan” BC diseases that might complicate the accurate design of powerful clinical trials with sufficient number of patients. In contrast, the integration of a straightforward and inexpensive IHC-based subclassification of cHER2+ BC into “basal-like/cHER2+” and “non-basal/cHER2+” subtypes is likely to provide better-quality prognostic and predictive information that might streamline translational medicine for the treating oncologist. T-DM1 has received regulatory approval for treatment-refractory HER2+ metastatic or locally advanced BC. Therefore, if T-DM1 or other new CSC-targeting agents now entering clinical trials might improve clinical outcomes for patients with trastuzumab-unresponsive basal/cHER2+ BC, the reclassification of cHER2 tumors based on basal and CSC-related markers (Figure 5) will undoubtedly lead to further gains for women diagnosed with cHER2+ BC disease. Nevertheless, our model proposes that a reclassification of cHER2+ tumors based on the spectrum of molecular BC subtypes might inform on their CSC-determined sensitivity to trastuzumab at the level of individual tumors (BOX1), thus providing a better delineation of the predictive value of cHER2+ in BC by incorporating CSC-driven intra-tumor heterogeneity into clinical decisions.

BOX 1. CSC-DRIVEN TUMOR HETEROGENEITY AND TRASTUZUMAB RESISTANCE IN cHER2+ BC

One of the greatest challenges for BC therapy is the occurrence of intra-tumor cellular heterogeneity [115-118], which negatively affects the efficacy of different approaches to cancer treatment including biological agents such as the anti-HER2 monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin). Although the mechanisms driving intratumoral variation of cellular function have remained uncertain until recently, we are accumulating ever-growing evidence that genetic diversity, epigenetics, and the tumor microenvironment ultimately determine the integrated functioning of molecular programs that govern and maintain CSCs across the diverse molecular subtypes of BC [119, 120]. In our current CSC-based framework of primary resistance to trastuzumab in cHER2+ BC, genetic (i.e., mutational landscape) and non-genetic (i.e., epigenetic and microenvironmental) mechanisms collectively but differentially contribute to tumor heterogeneity of cHER2+ tumors belonging to each molecular subtype of cHER2+ BC (i.e., luminal A/cHER2+, luminal B/cHER2+, HER2-enriched/cHER2+, basal/cHER2+, and claudin-low/cHER2+; Figure B1-1).

SOURCES OF CSC-RELATED TUMOR HETEROGENEITY IN cHER2+ BC

Cellular origin and mutation profile across the spectrum of cHER2+ BC

Each molecular subtype of cHER2+ BC has a different cell-of-origin (e.g., mammary stem cells, bipotent progenitors, luminal progenitors, late luminal progenitors or more committed, differentiated luminal cells), which may represent a stage of developmental arrest for a cHER2+ tumor with an origin earlier in the differentiation hierarchy or, alternatively, transformation of a cell type at one specific stage of development in the normal breast tissue [91, 121, 122]. In addition to having different cells of origin, the different molecular subtypes of cHER2+ BC are characterized by different mutational profiles. Thus, beyond the overexpression/amplification of HER2 shared among all of them, each of the molecular subtypes of cHER2+ BC have a different mutational landscape [123-126], e.g., whereas the most frequent genetic alteration expected to be found in luminal A/cHER2+ BC is the mutational activation of PI3K signaling, basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ BC subtypes almost always contain mutations in TP53 as well as genomic alterations in PTEN (Figure B1-2).

Variations in trastuzumab-responsive versus trastuzumab-refractory CSC types across the spectrum of cHER2+ BC

Beyond the mutation profile as a source of genetic heterogeneity in the distinct molecular subtypes of cHER2+ tumors, another level of epigenetic heterogeneity arises from the nature of the cells that are responsible for tumor maintenance and progression in each cHER2+ BC subtype, i.e., the so-called CSCs. Despite the diversity of genetic changes driving the different molecular subtypes, two different types of CSCs exist in any of the cHER2+ BC subtypes: a more proliferative, epithelial-like state characterized by the expression of the CSC marker ALDH, and a more quiescent and invasive, mesenchymal-like state characterized by the expression of the CD44⁺CD24^{-/low} immunophenotype [56, 120] (Figure B1-2). This apparently paradoxical phenomenon is suggestive of common, shared regulatory pathways capable of directing self-renewal and differentiation of solely two major types of CSCs regardless of the intrinsic molecular BC subtype in which they reside. Remarkably, however, each molecular subtype of cHER2+ BC is expected to exhibit significantly different frequencies of trastuzumab-responsive epithelial CSCs (E-CSCs) and trastuzumab-refractory mesenchymal CSCs (M-CSCs). Thus, claudin-low/cHER2+ and basal/cHER2+ subtypes should contain a significant proportion of trastuzumab-unresponsive CD44⁺CD24^{-/low}-expressing M-CSCs, the HER2e/cHER2+ subtype will be characterized by a high proportion of trastuzumab-sensitive ALDH-positive E-CSCs, the luminal B/cHER2 would contain a lower proportion of CSCs than HER2e/cHER2+, basal/cHER2+, and claudin-low/cHER2+ subtypes, and the luminal A/cHER2 subtype will display the lowest proportion of cells expressing any CSC marker.

Plasticity of E- and M-CSC states and acquisition of trastuzumab-refractory M-CSC-like states

The bidirectional transition between E- and M-CSC states is mediated by plastic, EMT/MET-related epigenetic alterations contextually regulated by signals originating mostly in the tumor microenvironment (e.g., cytokines/chemokines), transcriptional regulation (e.g., microRNAs), or some combination thereof [56, 120, 127-131]. Two types of differentiated tumor cells are derived from the E- and M-CSC states: An epithelial type produced by E-CSCs, which are common in most of the cHER2+ subtypes, and mesenchymal bulk tumor cells derived from M-CSCs, which are rare in the majority of cHER2+ subtypes (i.e., luminal A/cHER2+, luminal B/cHER2+ and HER2e/cHER2+) but observable or common in the basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+ subtypes. While the epithelial or mesenchymal bulk cell progeny will

secrete signals to positively reinforce the self-renewal of their corresponding parental E- and M-CSCs, it should be noted that more stem-like or mesenchymal phenotype cells can appear, and shift, at any time during tumor evolution, leading to mixed cell populations in cHER2+ tumors with respect to more epithelial cell properties. Thus, non-stem, bulk epithelial tumor cells in any of the cHER2+ subtypes of luminal origin can undergo an EMT phenotypic shift resulting in increased numbers of trastuzumab-refractory M-CSCs, which naturally occur at high numbers in the claudin-low/cHER2+ subtype originating from less committed mammary stem cells.

Moreover, there is evidence that more differentiated tumor cells may acquire CSC properties through nuclear reprogramming-like dedifferentiation phenomena; the range or probability of dedifferentiation rates of bulk tumor cells into CSC-like states [132-137], however, is expected to be inversely proportional to the number of cellular generations removed from being a CSC. Although all these closely related mechanisms can *de novo* repopulate CSCs in trastuzumab-treated cHER2+ BC, the intrinsic capacity to lower the epigenetic barriers responsible for cellular plasticity will vary across the molecular subtypes of cHER2+ tumors, thus determining not only their varying proportions of the two E- and M-states of CSCs, but also the proclivity to generate CSC states *via* the EMT or dedifferentiation phenomena (Figure B1-2).

Intrinsic subtype-dependent plasticity of CSCs in cHER2+ BC

Dedifferentiation and reprogramming, two highly related versions of cancer cellular plasticity that can generate heterogeneity across the different molecular subtypes of cHER2+ BC through evolutionary time, will substantially but differentially reduce the effectiveness of trastuzumab across the spectrum of cHER2+ BC subtypes. In other words, although these mechanisms, altogether, could certainly contribute to the emergence of new clones in cHER2+ tumors with respect to plasticity for evolution and/or reversibility of tumor-initiating and self-renewal CSC-like properties, their dynamics will be intrinsically constrained not only by their inherited epigenetic programming (i.e., the cell compartments from which a given cHER2+ subtype arises), but also by the specific genetic portraits of each molecular BC subtype.

Epigenetic mechanisms

Chromatin state shifts may be vital to dictate plasticity in HER2+ BC cells because bivalent chromatin, i.e., simultaneous maintenance of both active and repressed marks at promoter regions of developmental genes [127-130], may hold genes in a so-called poised state that, if activated by specific microenvironmental signals, would either allow non-CSC and CSC-like mesenchymal cells

to accrue epithelial characteristics, or non-CSC and CSC-like epithelial cells to accrue mesenchymal characteristics. Altered chromatin patterns during cancer development would be a factor for evolution of cellular heterogeneity [138] by helping to lock in specific tumor phenotypes. On the one hand, the development of cHER2+ BC with a luminal phenotype, which derives from committed cell compartments in normal breast epithelium, may evolve over a longer time course with more chromatin evolution from bivalency to a more stable cancer-specific promoter DNA hypermethylation. On the other hand, the development of cHER2+ BC with a claudin-low or basal phenotype, which derives from a more primitive and/or less committed normal breast epithelial compartment, might arise faster with cell phenotypes more dependent on the retention of a more plastic, epigenetically poised (bivalent) control of chromatin states.

Crucially, for our current framework of CSC-driven primary resistance to trastuzumab, such bivalent modification at specific gene promoters, which facilitate the rapid dedifferentiation of phenotypically plastic cells to stem-like cells [127-130], would permit basal-type HER2+ cells to respond to the same stimulus in a qualitatively different manner than luminal type of HER2+ cells. At least some of the non-stem, bulk epithelial cells of basal/cHER2+ will be *a priori* poised to rapidly become dedifferentiated into M-CSC-like states. Thus, in response to certain microenvironments rich in EMT-inducing heterotypic signals, basal/cHER2+ are intrinsically expected to more rapidly switch to trastuzumab-refractory M-CSC-like states than cHER2+ tumors of luminal origin. Because the gain of an increasingly stable M-CSC phenotype is apparently dependent on the sustained presence of potent EMT-reinforcing signals [127-130], in their absence, M-CSCs may naturally revert to a more epithelial phenotype unless they are supported by the appropriate epigenetic modification. Therefore, because basal/cHER2+ tumors and cHER2+ tumors of luminal origin are also differentially enriched with CD44⁺ stem cells exhibiting bivalent chromatin configurations in E-cadherin and other epithelial-specific genes, they will also exhibit an intrinsically enhanced capacity to rapidly dedifferentiate into a CD24⁺ proliferative epithelial state following trastuzumab withdrawal.

M-CSCs can stably maintain their residence in the mesenchymal state through the activation of autocrine signaling loops that liberate M-CSCs from dependence on continuous paracrine EMT-inducing signals originating elsewhere within tissues [127-130]. This scenario may naturally occur in the claudin-low/cHER2+ subtype, in which the stable residence in a mesenchymal state will involve a highly stable silencing of key epithelial genes *via* DNA hypermethylation. This can be inherited with high fidelity over the course of multiple successive divisions. Nevertheless, a full spectrum of less-plastic DNA hypermethylated to highly plastic poised states of

chromatin will occur not only throughout the continuum of cHER2+ molecular subtypes but also to different extents in individual tumors, thus adding another layer of epigenetic complexity to intratumor heterogeneity in cHER2+ BC.

Genetic mechanisms

Beyond epigenetic diversity-mediated tolerance to trastuzumab, *bona fide* genetic mechanisms for drug resistance classically considered to solely affect the bulk cell populations might also augment CSC-driven heterogeneity in cHER2+ BC if such mutations lead to an increase in the frequency of trastuzumab-refractory M-CSC-like states. Because cHER2+ may consist of different sub-clones that carry a founder mutation(s) alone or additional acquired mutations that confer trastuzumab-resistant states, a pre-existing trastuzumab-resistant clone may remain unaffected and through outgrowth can come to dominate the entire cancer population.

For instance, *in situ* single-cell analyses are beginning to illuminate the fact that the frequency and topology of HER2 gene amplification and other key accompanying driving mutations such as PIK3CA significantly varies before and after treatment with chemotherapy. Of note, chemotherapy treatment appears to drastically modulate genetic diversity within HER2+ tumors by selecting for PIK3CA1-mutant cells, a minor subpopulation in treatment-naïve samples. Because activating mutations in PIK3CA, which are commonly associated with resistance to HER2-targeting agents [140-143], induce breast tumor heterogeneity by evoking cell dedifferentiation into multipotent stem-like states and promoting different cell fate switches [144, 145], their selection upon treatment with chemotherapeutic agents or other microenvironmental stresses might drastically accelerate tumor relapse and metastatic progression by altering the initial intrinsic phenotype of cHER2+ BC and generating M-CSC-like states refractory to anti-HER2 therapies [146]. Because mutations are shared between CSCs and their clonal progeny, the fact that intratumoral cell heterogeneity significantly increases in the spectrum of luminal-to-basal subtypes can explain how genetic and epigenetic heterogeneity can coalesce at the CSC level to differentially affect tumor evolution and clinical progression in individual tumors belonging to each cHER2+ molecular subtype (Figure B1-2).

In this integrated view, the genetic and CSC-based developmental and/or hierarchical models of BC, often considered as mutually exclusive when describing tumor heterogeneity, can be harmonized by considering the CSC state as a central biological property or epigenetic process upon which different mutational profiles across the subtypes of cHER2+ BC coalesce. Moreover, an intrinsic subtype-dependent degree of plastic, epigenetically poised (bivalent) chromatin states combined with an intrinsic subtype-dependent degree of intratumoral cell-to-cell

heterogeneity may ultimately dictate how new genomic alterations acquired over time may *de novo* generate new CSCs as well as clones of differentiated progeny to differentially generate cellular heterogeneity in the natural history of individual tumors belonging to each molecular subtype of cHER2+ BC. That is to say, more poised epigenetic states in individual tumors belonging to certain subtypes of HER2+ tumor cells might generate higher degrees of diversity in gene expression patterns that can rapidly evolve through trastuzumab selection during treatment, thus driving multistep epigenetic fixation of gene expression in response to trastuzumab-based therapy.

THERAPEUTIC IMPLICATIONS OF CSCS-RELATED INTRA-TUMOR CELL HETEROGENEITY IN cHER2+ BC

The development of specific, individualized therapeutic strategies has emphasized genomic and phenotypic differences between major BC subtypes but has largely been designed to target bulk tumor cell populations. Interestingly, the HER2-targeting antibody trastuzumab likely represents the sole currently available agent that simultaneously targets the bulk epithelial tumor population and the epithelial type of CSCs in BC. Unexpectedly, this will confound stratified treatment decisions (i.e., trastuzumab-based therapy) that are solely based on one sole mutation biomarker (i.e., HER2 gene amplification/HER2 protein overexpression). Indeed, the optimum therapeutic benefit of trastuzumab-based HER2 blockade will arise when the successful reduction of both HER2+ bulk tumor epithelial populations and HER2+-E-CSC takes place in an individual cHER2+ tumor (Figure B1-3). Conversely, poorer responses are *a priori* expected in tumors belonging to cHER2+ subtypes enriched with trastuzumab-unresponsive non-CSC mesenchymal bulk tumor cells and M-CSCs (i.e., basal/cHER2+ and claudin-low/cHER2+), or in those with an increased proclivity to alter their initial intrinsic phenotype.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2012-38914), Plan Nacional de I+D+I, Spain and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (Grant 2014 SGR229), Departament d'Economia i Coneixement, Catalonia, Spain to Javier A. Menendez. The authors would like to thank Dr. Kenneth McCreath for editorial support. This work was supported also by a grant from the Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (EC10-125, Ayudas a la Investigación Independiente) to Begoña Martín-Castillo.

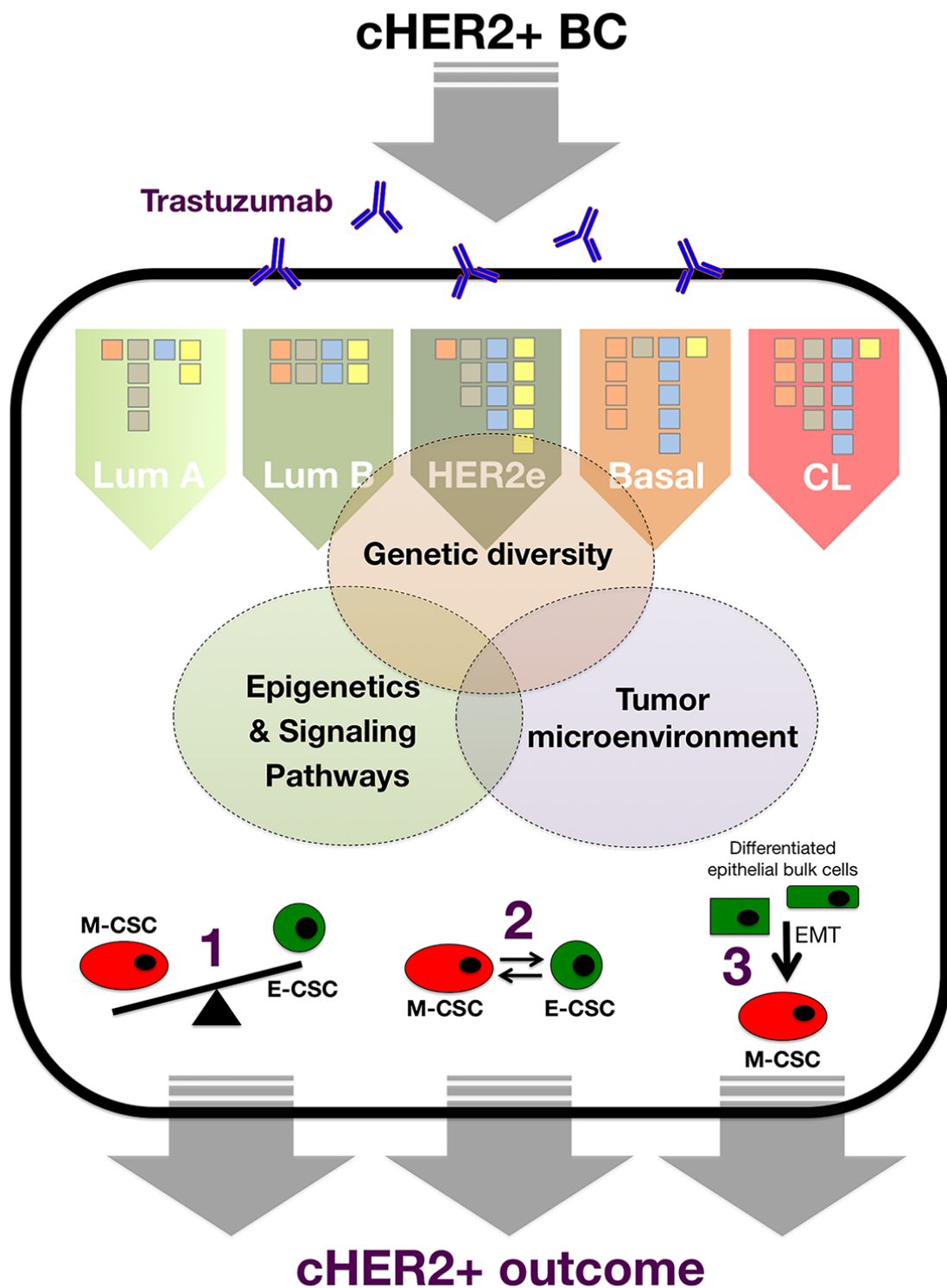


Figure B1-1: The clinical relevance of each genetic, epigenetic, and microenvironmental facet in terms of trastuzumab failure and recurrence of individual cHER2+ tumors will be related to the extent to which each mechanism, across the spectrum of cHER2+ BC molecular subtypes, impinges on intra-tumor cellular heterogeneity via: 1.) the frequency of the trastuzumab-responsive epithelial-CSC type the versus trastuzumab-resistant mesenchymal-CSC type, 2.) the intrinsic differential plasticity that mediates the balance between the two CSC states, and 3.) the intrinsic proclivity of bulk tumor cells to dedifferentiate and acquire trastuzumab-resistant mesenchymal-CSC-like states.

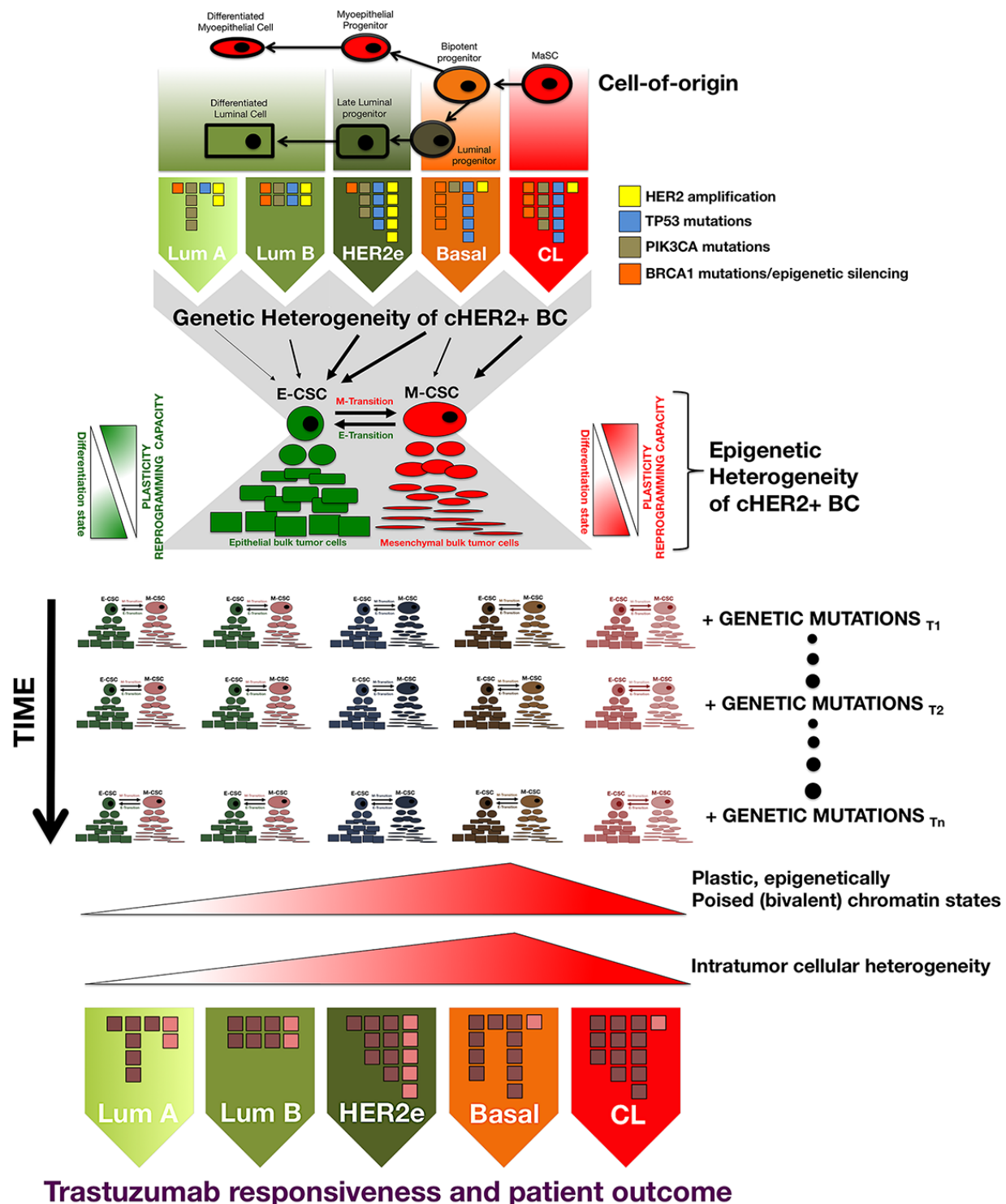


Figure B1-2: Genetic and epigenetic heterogeneity coalesce at the CSC level to differentially affect tumor evolution and clinical progression in individual tumors belonging to each cHER2+ molecular subtype. CSC states may serve as the unit of selection in the genetic evolution of individual cHER2+ tumors belonging to luminal A/cHER2+, luminal B/cHER2+, HER2-enriched/cHER2+, basal/cHER2+, and claudin-low/cHER2+ subtypes because genetic and non-genetic mechanisms can influence CSC properties by acting not only simultaneously but also independently over time, thereby differentially influencing trastuzumab responsiveness, tumor progression, and patient survival in each mixed subtype of cHER2+ BC.

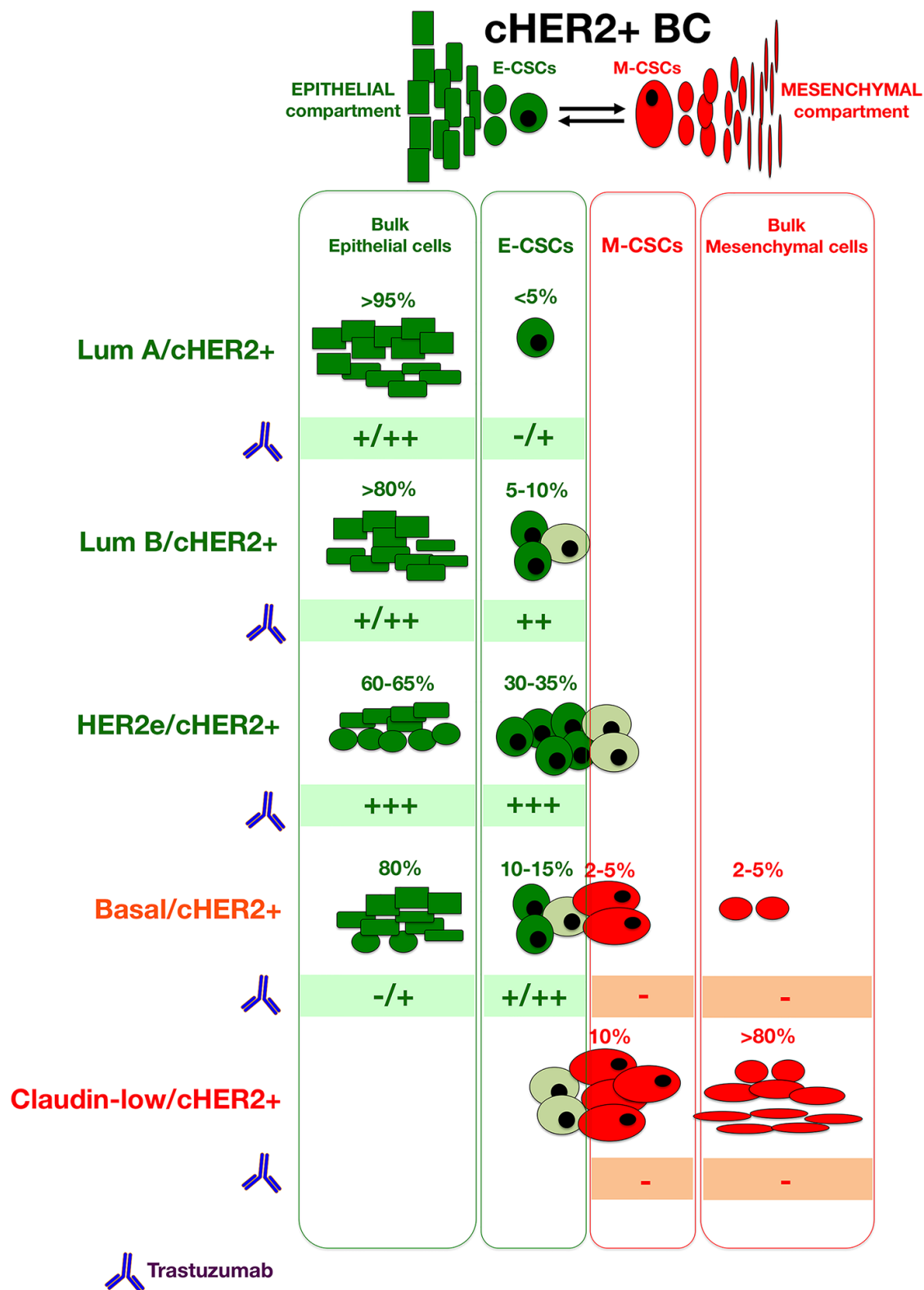


Figure B1-3: When considering the activity of trastuzumab in each type of bulk and CSC cellular compartments across the spectrum of molecular BC subtypes, we can provide a better a priori delineation of the predictive value of cHER2+ in BC in terms of trastuzumab responsiveness at the level of individual tumors, thus incorporating CSC-driven intra-tumor heterogeneity into clinical decisions.

CONFLICTS OF INTEREST

there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:718-30.
2. Weigelt B, Pusztai L, Ashworth A, Reis-Filho JS. Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 9:58-64.
3. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Rakha EA, Richardson AL, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Weigelt B, Ellis IO, Reis-Filho JS. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011; 24:157-67.
4. Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol*. 2012;19:39-53.
5. Ignatiadis M, Sotiriou C. Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10:494-506.
6. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:683-92.
7. Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessy BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Ann Oncol*. 2012; 23:2997-3006.
8. Turner NC, Reis-Filho JS. Tackling the diversity of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:6380-8.
9. Le Du F, Eckhardt BL, Lim B, Litton JK, Moulder S, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, Ueno NT. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget*. 2015;6:12890-12908.
10. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011;9:16-32.
11. Esteva FJ, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN. Molecular predictors of response to trastuzumab and lapatinib in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; 7:98-107.
12. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 10:x207-10.
13. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31:3997-4013.
14. Swain SM, Clark E, Baselga J. Treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2015;372:1964-5.
15. Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J, Parker JS, Perou CM, Baselga J. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(8). pii: dju152. doi: 10.1093/jnci/dju152.
16. Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, Ryan PD, Come SE, Burstein HJ, Lesnikowski BA, Kamma M, Friedman PN, Gelman R, Iglehart JD, Winer EP. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13:1198-207.
17. Liu H, Fan Q, Zhang Z, Li X, Yu H, Meng F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Hum Pathol*. 2008;39:167-74.
18. Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del Barco S, Bernado L, Brunet J, López-Bonet E, Menéndez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol*. 2010;37:669-78.
19. Bagaria SP, Ray PS, Wang J, Kropcho L, Chung A, Sim MS, Shamonki JM, Martino S, Cui X, Giuliano AE. Prognostic value of basal phenotype in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:935-40.
20. Oliveras-Ferreros C, Corominas-Faja B, Cufí S, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Iglesias JM, López-Bonet E, Martín ÁG, Menéndez JA. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2012;11:4020-32.
21. Martín-Castillo B, Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Moreno JM, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martín ÁG, López-Bonet E, Menéndez JA. Basal/HER2 breast carcinomas: integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2013;12:225-45.
22. Martín-Castillo B, López-Bonet E, Buxó M, Dorca J, Tuca-Rodríguez F, Ruano MA, Colomer R, Menéndez JA. Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6:7104-22.
23. Chung A, Choi M, Han B, Bose S, Zhang X, Medina-Kauwe L, Sims J, Murali R, Taguiam M, Varda M, Schiff R, Giuliano A, Cui X. Basal protein expression is associated with worse outcome and trastuzumab resistance in Her2+

- invasive breast cancer. *Clin Breast Cancer* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2015.06.001>
24. Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:1585-92.
 25. Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14:55-66.
 26. Mehta K, Osipo C. Trastuzumab resistance: role for Notch signaling. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:1438-48.
 27. Korkaya H, Wicha MS. HER-2, notch, and breast cancer stem cells: targeting an axis of evil. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1845-7.
 28. Fessler SP, Wotkowicz MT, Mahanta SK, Bamdad C. MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;118:113-24.
 29. Reim F, Dombrowski Y, Ritter C, Buttmann M, Häusler S, Ossadnik M, Krockenberger M, Beier D, Beier CP, Dietl J, Becker JC, Hönig A, Wischhusen J. Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44^{high}/CD24^{low}/HER2^{low} breast cancer stem cells. *Cancer Res*. 2009;69:8058-66.
 30. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, Lopez-Bonet E, Brunet J, Menendez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos) CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397:27-33.
 31. Dhillon J, Astanehe A, Lee C, Fotovati A, Hu K, Dunn SE. The expression of activated Y-box binding protein-1 serine 102 mediates trastuzumab resistance in breast cancer cells by increasing CD44⁺ cells. *Oncogene*. 2010;29:6294-300.
 32. Cirenajwis H, Smiljanic S, Honeth G, Hegardt C, Marton LJ, Oredsson SM. Reduction of the putative CD44+CD24- breast cancer stem cell population by targeting the polyamine metabolic pathway with PG11047. *Anticancer Drugs*. 2010;21:897-906.
 33. Cufí S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Dorca J, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget*. 2012;3:395-8.
 34. Korkaya H, Kim GI, Davis A, Malik F, Henry NL, Ithimakin S, Quraishi AA, Tawakkol N, D'Angelo R, Paulson AK, Chung S, Luther T, Paholak HJ, Liu S, Hassan KA, Zen Q, Clouthier SG, Wicha MS. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol Cell*. 2012;47:570-84.
 35. Hanker AB, Pfefferle AD, Balko JM, Kuba MG, Young CD, Sánchez V, Sutton CR, Cheng H, Perou CM, Zhao JJ, Cook RS, Arteaga CL. Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:14372-7.
 36. Chung SS, Giehl N, Wu Y, Vadgama JV. STAT3 activation in HER2-overexpressing breast cancer promotes epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell traits. *Int J Oncol*. 2014;44:403-11.
 37. Ding K, Banerjee A, Tan S, Zhao J, Zhuang Q, Li R, Qian P, Liu S, Wu ZS, Lobie PE, Zhu T. Artemin, a member of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of ligands, is HER2-regulated and mediates acquired trastuzumab resistance by promoting cancer stem cell-like behavior in mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2014;289:16057-71.
 38. Mao Y, Zhang Y, Qu Q, Zhao M, Lou Y, Liu J, Huang O, Chen X, Wu J, Shen K. Cancer-associated fibroblasts induce trastuzumab resistance in HER2 positive breast cancer cells. *Mol Biosyst*. 2015;11:1029-40.
 39. Yang Z, Guo L, Liu D, Sun L, Chen H, Deng Q, Liu Y, Yu M, Ma Y, Guo N, Shi M. Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop. *Oncotarget*. 2015;6:5072-87.
 40. Boulbes DR, Chauhan GB, Jin Q, Bartholomeusz C, Esteva FJ. CD44 expression contributes to trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;151:501-13.
 41. Chakrabarty A, Bhola NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B, Chang JC, Arteaga CL. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Res*. 2013;73:1190-200.
 42. Rexer BN, Arteaga CL. Optimal targeting of HER2-PI3K signaling in breast cancer: mechanistic insights and clinical implications. *Cancer Res*. 2013;73:3817-20.
 43. Valabrega G, Capellero S, Cavalloni G, Zaccarello G, Petrelli A, Migliardi G, Milani A, Peraldo-Neia C, Gammaitoni L, Sapino A, Pecchioni C, Moggio A, Giordano S, Aglietta M, Montemurro F. HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:29-40.
 44. Oliveras-Ferraro C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Torres-Garcia VZ, Sauri-Nadal T, Barco SD, Lopez-Bonet E, Brunet J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407:412-9.
 45. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med*. 2006;12:537-44.

46. Storci G, Sansone P, Trere D, Tavorali S, Taffurelli M, Ceccarelli C, Guarnieri T, Paterini P, Pariali M, Montanaro L, Santini D, Chieco P, Bonafé M. The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression. *J Pathol.* 2008;214:25-37.
47. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Pathobiological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113:411-22.
48. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40:499-507.
49. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R53.
50. Tan AR, Alexe G, Reiss M. Transforming growth factor-beta signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res Treat.* 2009;115:453-95.
51. Nakshatri H, Srour EF, Badve S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009;4:50-60.
52. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* 2009;69:4116-24.
53. DiMeo TA, Anderson K, Phadke P, Fan C, Perou CM, Naber S, Kuperwasser C. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69:5364-73.
54. Rennstam K, McMichael N, Berglund P, Honeth G, Hegardt C, Rydén L, Luts L, Bendahl PO, Hedenfalk I. Numb protein expression correlates with a basal-like phenotype and cancer stem cell markers in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122:315-24.
55. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 2011;64:937-46.
56. Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, Wicha MS. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2013;2:78-91.
57. Koziel JE, Herbert BS. The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;149:607-18.
58. Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene.* 2008;27:6120-30.
59. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:672-9.
60. Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res.* 2009;15:2010-21.
61. Roesler R, Cornelio DB, Abujamra AL, Schwartzmann G. HER2 as a cancer stem-cell target. *Lancet Oncol.* 2010;11:225-6.
62. Nakanishi T, Chumsri S, Khakpour N, Brodie AH, Leyland-Jones B, Hamburger AW, Ross DD, Burger AM. Side-population cells in luminal-type breast cancer have tumour-initiating cell properties, and are regulated by HER2 expression and signalling. *Br J Cancer.* 2010;102:815-26.
63. Tuma RS. Cancer stem cell hypothesis and trastuzumab in HER2-negative tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104:968-9.
64. Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF, Quraishi AA, Ignatoski KW, Daignault S, Davis A, Hall CL, Palanisamy N, Heath AN, Tawakkol N, Luther TK, Clouthier SG, Chadwick WA, Day ML, Kleer CG, Thomas DG, Hayes DF, Korkaya H, Wicha MS. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res.* 2013;73:1635-46.
65. Korkaya H, Wicha MS. HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. *Cancer Res.* 2013;73:3489-93.
66. Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1409-11.
67. Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, Martino S, Sledge GW, Harris LN, Gralow JR, Dueck AC, Ketterling RP, Ingle JN, Lingle WL, Kaufman PA, Visscher DW, Jenkins RB. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol.* 2010;28:4307-15.
68. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferreros C, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martin-Castillo B, Menendez JA. Autophagy-related gene 12 (ATG12) is a novel determinant of primary resistance to HER2-targeted therapies: utility of transcriptome analysis of the autophagy interactome to guide breast cancer treatment. *Oncotarget.* 2012;3:1600-14.

69. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18:17-25.
70. Marcato P, Dean CA, Pan D, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, Helyer L, Pan L, Leidal A, Gujar S, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells.* 2011;29:32-45.
71. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 2011;10:1378-84.
72. Croker AK, Goodale D, Chu J, Postenka C, Hedley BD, Hess DA, Allan AL. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med.* 2009;13:2236-52.
73. Croker AK, Allan AL. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;133:75-87.
74. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3983-8.
75. Dontu G, Liu S, Wicha MS. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev.* 2005;1:207-13.
76. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R25.
77. Keller PJ, Arendt LM, Skibinski A, Logvinenko T, Klebba I, Dong S, Smith AE, Prat A, Perou CM, Gilmore H, Schnitt S, Naber SP, Garlick JA, Kuperwasser C. Defining the cellular precursors to human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:2772-7.
78. Sarrio D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells.* 2012;30:292-303.
79. Bhagirath D, Zhao X, West WW, Qiu F, Band H, Band V. Cell type of origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget.* 2015; 6:9018-30.
80. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61-70.
81. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1:555-67.
82. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol.* 2008;26:2813-20.
83. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, Huntsman D, Olivetto IA, Nielsen TO, Gelmon K. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008;26:5697-704.
84. Alexe G, Dalgin GS, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, DeLisi C, Harris L, Barnard N, Martel M, Levine AJ, Ganesan S, Bhanot G. High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res.* 2007;67:10669-76.
85. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, Manjili MH. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol.* 2012;43:364-73.
86. Lin Y, Zhong Y, Guan H, Zhang X, Sun Q. CD44+/CD24- phenotype contributes to malignant relapse following surgical resection and chemotherapy in patients with invasive ductal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31:59.
87. Chekhun SV, Zadovny TV, Tymovska YO, Anikusko MF, Novak OE, Polishchuk LZ. CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol.* 2015;37:58-63.
88. Wu Y, Ginther C, Kim J, Mosher N, Chung S, Slamon D, Vadgama JV. Expression of Wnt3 activates Wnt/ β -catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res.* 2012;10:1597-606.
89. Kim HP, Han SW, Song SH, Jeong EG, Lee MY, Hwang D, Im SA, Bang YJ, Kim TY. Testican-1-mediated epithelial-mesenchymal transition signaling confers acquired resistance to lapatinib in HER2-positive gastric cancer. *Oncogene.* 2014;33:3334-41.
90. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12:R68.
91. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011 Feb;5(1):5-23.
92. Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, Harrell JC, Roman E, Adamo B, Troester M, Perou CM. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; 142:237-55.
93. Lesniak D, Sabri S, Xu Y, Graham K, Bhatnagar P, Suresh M, Abdulkarim B. Spontaneous epithelial-mesenchymal transition and resistance to HER-2-targeted therapies

- in HER-2-positive luminal breast cancer. *PLoS One*. 2013;8:e71987.
94. Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*. 2008;122:999-1004.
 95. Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, Bettelli S, Conte PF. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2013;24:2990-4.
 96. Hurley J, Doliny P, Reis I, Silva O, Gomez-Fernandez C, Velez P, Pauletti G, Powell JE, Pegram MD, Slamon DJ. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:1831-8.
 97. Lower EE, Glass E, Blau R, Harman S. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:301-6.
 98. Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, Esteva FJ, Buzdar AU, Chen H, Eksambi S, Hortobagyi GN, Baselga J, Gonzalez-Angulo AM. Loss of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res*. 2009;15:7381-8.
 99. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Bergh J, Isola J. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:4185-91.
 100. Phillips S, Kuperwasser C. SLUG: Critical regulator of epithelial cell identity in breast development and cancer. *Cell Adh Migr*. 2014;8:578-87.
 101. Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, Zhao J, Gu B, Zheng GX, Yang AG, Jia LT. MiR-200c suppresses TGF- β signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J Cancer*. 2014;135:1356-68.
 102. Shi SJ, Wang LJ, Yu B, Li YH, Jin Y, Bai XZ. LncRNA-ATB promotes trastuzumab resistance and invasion-metastasis cascade in breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6:11652-63.
 103. Sjöström M, Hartman L, Honeth G, Grabau D, Malmström P, Hegardt C, Fernö M, Niméus E. Stem cell biomarker ALDH1A1 in breast cancer shows an association with prognosis and clinicopathological variables that is highly cut-off dependent. *J Clin Pathol*. 2015 Jul 14. pii: jclinpath-2015-203092.
 104. Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, Lee BN, Tin S, De Laurentiis M, Parker CA, Alvarez RH, Valero V, Ueno NT, De Placido S, Mani SA, Esteva FJ, Cristofanilli M, Reuben JM. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:2526-34.
 105. Kallergi G, Papadaki MA, Politaki E, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Epithelial to mesenchymal transition markers expressed in circulating tumour cells of early and metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R59.
 106. Raimondi C, Gradilone A, Naso G, Vincenzi B, Petracca A, Nicolazzo C, Palazzo A, Saltarelli R, Spremberg F, Cortesi E, Gazzaniga P. Epithelial-mesenchymal transition and stemness features in circulating tumor cells from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;130:449-55.
 107. Papadaki MA, Kallergi G, Zafeiriou Z, Manouras L, Theodoropoulos PA, Mavroudis D, Georgoulas V, Agelaki S. Co-expression of putative stemness and epithelial-to-mesenchymal transition markers on single circulating tumour cells from patients with early and metastatic breast cancer. *BMC Cancer*. 2014;14:651.
 108. Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, Lai R, Thoms J, Murray D, Gosh S, Mackey JR, Sabri S, Abdulkarim B. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res*. 2009;69:8620-8.
 109. Mocanu MM, Fazekas Z, Petrás M, Nagy P, Sebestyén Z, Isola J, Timár J, Park JW, Vereb G, Szöllosi J. Associations of ErbB2, beta1-integrin and lipid rafts on Herceptin (Trastuzumab) resistant and sensitive tumor cell lines. *Cancer Lett*. 2005;227:201-12.
 110. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126:355-64.
 111. Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveras-Ferraro C, Bosch-Barrera J, Joven J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*. 2011;2:896-917.
 112. Martin-Castillo B, Dorca J, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Lopez-Bonet E, Garcia M, Del Barco S, Menendez JA. Incorporating the antidiabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab: an ongoing clinical-translational research experience at the Catalan Institute of Oncology. *Ann Oncol*. 2010;21(1):187-9.
 113. Diessner J, Bruttel V, Stein RG, Horn E, Häusler SF, Dietl J, Hönig A, Wischhusen J. Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1). *Cell Death Dis*. 2014;5:e1149.
 114. Barok M, Tanner M, Könink K, Isola J. Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells *in vivo*. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R46.
 115. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*. 2011;121:3786-8.
 116. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour

heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*. 2012;12:323-34.

117. Bhatia S, Frangioni JV, Hoffman RM, Iafrate AJ, Polyak K. The challenges posed by cancer heterogeneity. *Nat Biotechnol*. 2012;30:604-10.
118. Alizadeh AA, Aranda V, Bardelli A, Blanpain C, Bock C, Borowski C, Caldas C, Califano A, Doherty M, Elsner M, Esteller M, Fitzgerald R, Korbel JO, Lichter P, Mason CE, Navin N, Pe'er D, Polyak K, Roberts CW, Siu L, Snyder A, Stower H, Swanton C, Verhaak RG, Zenklusen JC, Zuber J, Zucman-Rossi J. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med*. 2015;21:846-53.
119. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*. 2014;14:275-91.
120. Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015;17:260-71.
121. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009;15:842-4.
122. Perou CM, Børresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011; 3. pii: a003293.
123. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 490:61-70.
124. Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell GR, Yates LR, Papaemmanuil E, Beare D, Butler A, Cheverton A, Gamble J, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, Lau KW, McLaren S, McBride DJ, Menzies A, Mudie L, Raine K, Rad R, Chapman MS, Teague J, Easton D, Langerød A; Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC), Lee MT, Shen CY, Tee BT, Huimin BW, Broeks A, Vargas AC, Turashvili G, Martens J, Fatima A, Miron P, Chin SF, Thomas G, Boyault S, Mariani O, Lakhani SR, van de Vijver M, van 't Veer L, Foekens J, Desmedt C, Sotiriou C, Tutt A, Caldas C, Reis-Filho JS, Aparicio SA, Salomon AV, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486:400-4.
125. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng SW, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin SF, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadiotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA, Aparicio S. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486:395-9.
126. Gray J, Druker B. Genomics: the breast cancer landscape. *Nature*. 2012;486:328-9.
127. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med*. 2013;19:1438-49.
128. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Poised with purpose: cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell Cycle*. 2013;12:2713-4.
129. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem*. 2013;59:168-79.
130. Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13:497-512.
131. Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*. 2015;5:22-4.
132. Suvà ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*. 2013 Mar 29;339:1567-70.
133. Friedmann-Morvinski D, Verma IM. Dedifferentiation and reprogramming: origins of cancer stem cells. *EMBO Rep*. 2014;15:244-53.
134. Menendez JA, Corominas-Faja B, Cuyàs E, Alarcón T. Metabostemness: Metaboloepigenetic reprogramming of cancer stem-cell functions. *Oncoscience*. 2014;1:803-6.
135. Menendez JA, Alarcón T, Corominas-Faja B, Cuyàs E, López-Bonet E, Martin AG, Vellon L. Xenopatients 2.0: reprogramming the epigenetic landscapes of patient-derived cancer genomes. *Cell Cycle*. 2014;13:358-70.
136. Ohnishi K, Semi K, Yamada Y. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;455:10-5.
137. Goding CR, Pei D, Lu X. Cancer: pathological nuclear reprogramming? *Nat Rev Cancer*. 2014;14:568-73.
138. Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell*. 2014;54:716-27.
139. Janiszewska M, Liu L, Almendro V, Kuang Y, Pawletz C, Sakr RA, Weigelt B, Hanker AB, Chandarlapaty S, King TA, Reis-Filho JS, Arteaga CL, Park SY, Michor F, Polyak K. In situ single-cell analysis identifies heterogeneity for PIK3CA mutation and HER2 amplification in HER2-positive breast cancer. *Nat Genet*. 2015 Aug 24. doi: 10.1038/ng.3391.
140. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12:395-402.
141. Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, Paepke S, Lehmann A, Rezai M, Zahm DM, Sinn P, Khandan F, Eidtmann H, Dohnal K, Heinrichs C, Huober J, Pfitzner B, Fasching PA, Andre F, Lindner JL, Sotiriou C, Dykgers A, Guo S, Gade S, Nekljudova V, Loi S, Untch M, Denkert

C. PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (her2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol.* 2014;32:3212-20.

142. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, Bosma AJ, Eidtmann H, Holmes E, Sotiriou C, Fumagalli D, Jimenez J, Aura C, Prudkin L, Díaz-Delgado MC, de la Peña L, Loi S, Ellis C, Schultz N, de Azambuja E, Harbeck N, Piccart-Gebhart M, Bernards R, Baselga J. PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Apr 20;33(12):1334-9.
143. Cescon DW, Bedard PL. PIK3CA genotype and treatment decisions in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33:1318-21.
144. Koren S, Reavie L, Couto JP, De Silva D, Stadler MB, Roloff T, Britschgi A, Eichlisberger T, Kohler H, Aina O, Cardiff RD, Bentires-Alj M. PIK3CA(H1047R) induces multipotency and multi-lineage mammary tumours. *Nature.* 2015;525:114-8.
145. Van Keymeulen A, Lee MY, Ousset M, Brohée S, Rorive S, Girardi RR, Wuidart A, Bouvencourt G, Dubois C, Salmon I, Sotiriou C, Phillips WA, Blanpain C. Reactivation of multipotency by oncogenic PIK3CA induces breast tumour heterogeneity. *Nature.* 2015;525:119-23.
146. Hanker AB, Pfefferle AD, Balko JM, Kuba MG, Young CD, Sánchez V, Sutton CR, Cheng H, Perou CM, Zhao JJ, Cook RS, Arteaga CL. Mutant PIK3CA accelerates HER2-driven transgenic mammary tumors and induces resistance to combinations of anti-HER2 therapies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:14372-7.

Estudio #3

**Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis
kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties**

CELL CYCLE-2015

[DOI:10.1080/15384101.2015.1044173](https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1044173)

COPIA DEL AUTOR

Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties

Elisabet Cuyàs^{1,2,†}, Begoña Martín-Castillo^{2,3,†}, Bruna Corominas-Faja^{1,2}, Anna Massagué⁴,
Joaquim Bosch-Barrera^{2,5}, and Javier A Menéndez^{1,2,*}

¹Metabolism & Cancer Group; Translational Research Laboratory; Catalan Institute of Oncology (ICO); Girona; Catalonia, Spain; ²Girona Biomedical Research Institute (IDIBGI); Girona, Catalonia, Spain; ³Unit of Clinical Research; Catalan Institute of Oncology (ICO); Girona, Catalonia, Spain; ⁴Biochemistry and Molecular Biology Unit; Department of Biology; University of Girona; Girona, Catalonia, Spain; ⁵Medical Oncology Department; Catalan Institute of Oncology (ICO); Girona, Catalonia, Spain

[†]Equally contributing authors.

Key players in translational regulation such as ribosomes might represent powerful, but hitherto largely unexplored, targets to eliminate drug-refractory cancer stem cells (CSCs). A recent study by the Lisanti group has documented how puromycin, an old antibiotic derived from *Streptomyces alboniger* that inhibits ribosomal protein translation, can efficiently suppress CSC states in tumorspheres and monolayer cultures. We have used a closely related approach based on Biolog Phenotype Microarrays (PM), which contain tens of lyophilized antimicrobial drugs, to assess the chemosensitivity profiles of breast cancer cell lines enriched for stem cell-like properties. Antibiotics directly targeting active sites of the ribosome including emetine, puromycin and cycloheximide, inhibitors of ribosome biogenesis such as dactinomycin, ribotoxic stress agents such as daunorubicin, and indirect inhibitors of protein synthesis such as acriflavine, had the largest cytotoxic impact against claudin-low and basal-like breast cancer cells. Thus, biologically aggressive, treatment-resistant breast cancer subtypes enriched for stem cell-like properties exhibit exacerbated chemosensitivities to anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics targeting protein synthesis. These results suggest that old/existing microbicides might be repurposed not only as new cancer therapeutics, but also might provide the tools and molecular understanding needed to develop second-generation

inhibitors of ribosomal translation to eradicate CSC traits in tumor tissues.

Recent work from Lisanti's group has rekindled the interest of cancer researchers in using "old" antibiotics inhibiting protein synthesis as effective drugs to eliminate cancer stem cells (CSCs).¹ CSCs are implicated in disease recurrence and metastatic spread and are known to be resistant to many conventional therapies.^{2–7} In their hands, breast CSCs were significantly enriched for numerous ribosomal proteins and appeared to be addicted to protein synthesis. Additionally, they found that antibiotics such as puromycin, which competitively inhibits protein synthesis by mimicking the 3' end of an aminoacylated tRNA interacting with the A-site of the ribosome and also by generating puromycylated-peptides and causing premature release of the peptide chain, completely prevented CSC-formed mammospheres in a manner strictly dependent on the blockade of nascent protein synthesis by ribosomes.¹ Interestingly, puromycin preferentially targeted CSC cellular states because pre-incubation with the antibiotic in the setting of an attached monolayer fully prevented the later capacity of breast cancer cell populations to form microtumors in non-adherent non-differentiating conditions.¹

Global gene expression analyses have allowed the delineation of 5 different intrinsic subtypes of breast cancer: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched,

Keywords: Antibiotics, breast cancer, basal-like, Biolog, cancer stem cells, claudin-low, drug repositioning, drug repurposing, phenotype, ribosomes

*Correspondence to: Javier A Menéndez; Email: jmenendez@idibgi.org

Submitted: 03/03/2015

Accepted: 04/18/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1044173>

www.tandfonline.com

basal-like, and the recently characterized claudin-low group.⁸⁻¹¹ The most aggressive subtypes, claudin-low and basal-like, have the worst mortality rate among the intrinsic breast cancer subtypes due to higher grade at diagnosis, predilection for early metastasis and, importantly, lack of targeted therapy. Basal-like and claudin-low tumors are distinct from other breast cancer subtypes since they possess stem cell-like properties with high expression of mesenchymal and epithelial-to-mesenchymal (EMT) genes, which is thought to be reflective of a least-differentiated stage of epithelial development. Indeed, we are amassing evidence that the claudin-low breast cancer subtype should be viewed as the first example of adult carcinoma driven by aberrant reactivation of an embryonic-like stem cell transdifferentiation program.¹² Basal-like and claudin-low characteristics, which are also common in chemotherapy-resistant breast tumors,¹³ might represent different extents of reprogramming due to the aberrant activation of EMT inducers in committed cells (e.g., luminal progenitors).

An intimate relationship exists between EMT, CSCs, and the claudin-low and

basal-like subtypes of breast cancer, representing a cell state with aggressive and therapeutic resistant properties. Given that these breast carcinoma subtypes prominently exhibit enrichment and hyperactivation of oncogenic signaling cascades driven by c-MYC and mTOR,¹⁴⁻¹⁷ 2 key regulators of the translational machinery and protein synthesis, respectively, we recently hypothesized that pharmacological inhibition of deregulated protein synthesis might constitute a highly conserved target in multi-drug resistant claudin-low and basal-like tumor cells. Moreover, because drug repositioning (also termed re-profiling, therapeutic switching or drug repurposing) constitutes a useful strategy to accelerate the drug development process, we envisioned that one could combine both ideas by simultaneously exploring the cytotoxic activity of “old” antibiotics, antimalarials, antiprotozoals or anticancer drugs against a small panel of selected breast cancer cell lines highly representative of human claudin-low and basal-like tumors.

The claudin-low MDA-MB-231 and SUM-159PT^{10,11} cell lines and the basal-like HER2+ JIMT-1¹⁸⁻²⁴ cell line were

used in a chemical sensitivity screen. We utilized the Phenotype Microarray (PM) system, marketed and sold by Biolog (www.biolog.com), to measure the sensitivity of these cells to a wide variety of 92 antibiotics and other growth inhibitors in microplates (PM-M11 to PM-M14). This approach enables the testing of tens of phenotypes and the identification of shared sensitivities among claudin-low and basal-like breast cancer cells to a wide variety of drugs (Fig. 1). We arbitrarily grouped chemosensitivity responses of the breast cancer cell lines into 5 categories based on both the number of drug doses able to induce a growth inhibition rate greater than 50% and the number of drug-responsive cell lines (Fig. 2). Based on these criteria, 5 drugs showed the largest cytotoxic impact on the growth of claudin-low and basal-like cell lines: 1) Emetine, an anti-protozoal alkaloid used in the treatment of amebiasis that also displays potent anti-malarial activity, is known to interact with the E-site of the ribosomal small subunit and inhibit ribosome movement along mRNA,²⁵ thus irreversibly blocking protein synthesis. Two) Dactinomycin (also known

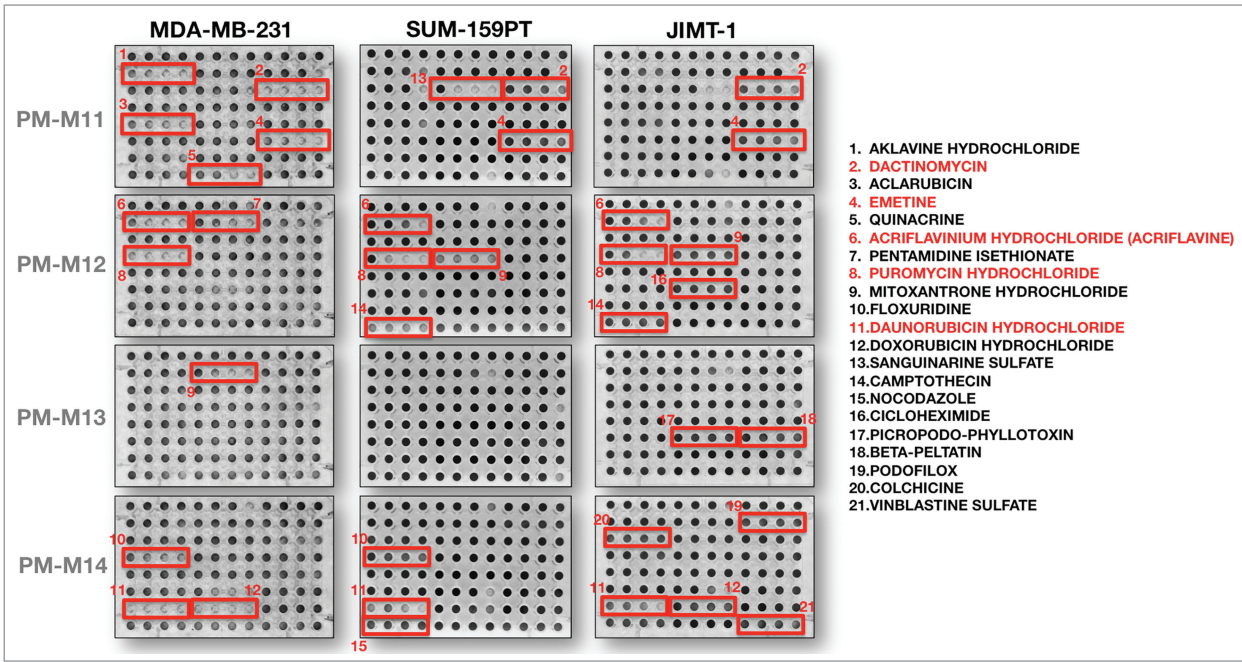


Figure 1. Rapid screening for anti-breast cancer antibiotics using Biolog Phenotype Microarrays. Representative micrographs of Phenotype Microarray analyses measuring tetrazolium dye reduction by MDA-MB-231, SUM-159PT, and JIMT-1 breast carcinoma cells cultured in the absence or presence of 92 antibiotics and other growth inhibitors. Red boxes denote highly active drugs in which at least 3 of the 4 graded concentrations decreased optical density by $\geq 50\%$ in each individual cell line. Drug names labeled in red denote those drugs exhibiting high activity in all 3 breast cancer cell lines.

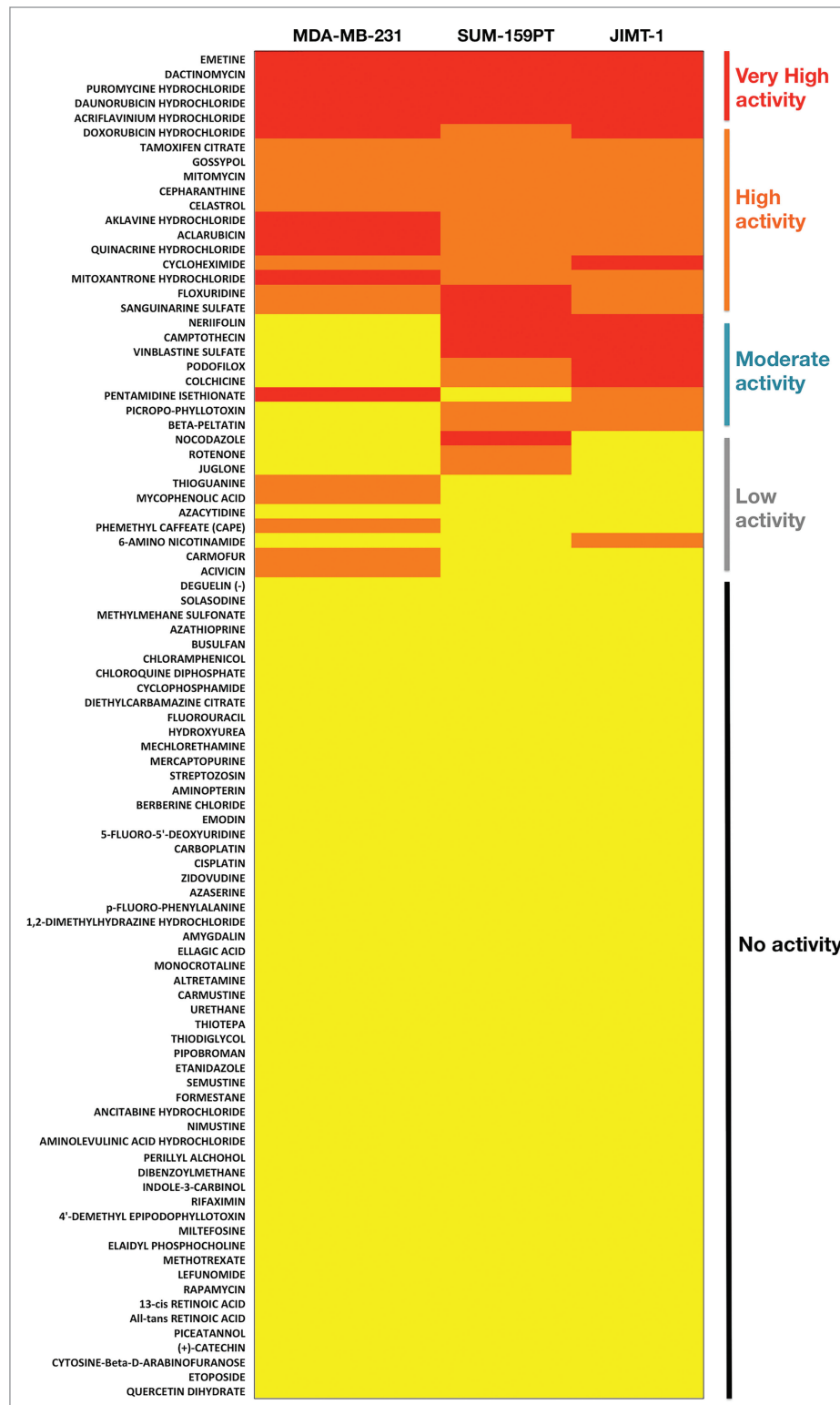


Figure 2. Chemosensitivity map of cell line models representative of breast cancer subtypes enriched for stem cell-like properties. A color-coding scheme assigned each drug to yellow (none of the 4 graded drug concentrations decreased cell growth by $\geq 50\%$), orange (at least one of the 4 graded concentrations decreased cell growth by $\geq 50\%$), or red (at least 3 of the 4 graded concentrations decreased cell growth by $\geq 50\%$) categories. Drugs were categorized as “very high active” if the red code occurred in all 3 cell lines, “high activity” if either the red or orange codes occurred in all 3 cell lines, “moderate activity” if either the red or orange codes occurred in 2 of the 3 cell lines, “low activity” if either the red or orange codes occurred in one of the 3 cell lines, and “no activity” when none of the color-coding categories occurred in the 3 cell lines.

170 generically as actinomycin D), the first
 polypeptide antibiotic shown to have
 anti-cancer activity, inhibits all RNA syn-
 thesis including ribosome biogenesis,
 which is reflected in an inhibition of pro-
 175 tein synthesis. Three) Puromycin inter-
 acts with the A-site of the ribosome and
 inhibits protein synthesis via premature
 chain termination. Four) Daunorubicin
 (daunomycin), a chemotherapeutic of

the anthracycline family, is a ribotoxic
 stress agent that inhibits protein transla-
 tion.²⁶ Five) Acriflavine, an intercalating
 antimetabolite used as a topical antiseptic,
 has been shown to rapidly inhibit
 protein synthesis to exert emetine-like
 amebicidal actions.

It is noteworthy that an inhibitory
 capacity on protein synthesis was shared
 by all the most effective antimicrobials

that efficiently inhibited growth of clau-
 din-low and basal-like breast carcinoma
 cells. Other well-known antibiotics capa-
 ble of effectively inhibiting protein synthe-
 sis such as cycloheximide, an elongation
 inhibitor that binds to the E site of ribo-
 somes, were among the drugs with a high
 activity profile against claudin-low and
 basal-like breast carcinomas (Fig. 2).
 Although cancer cell lines representative

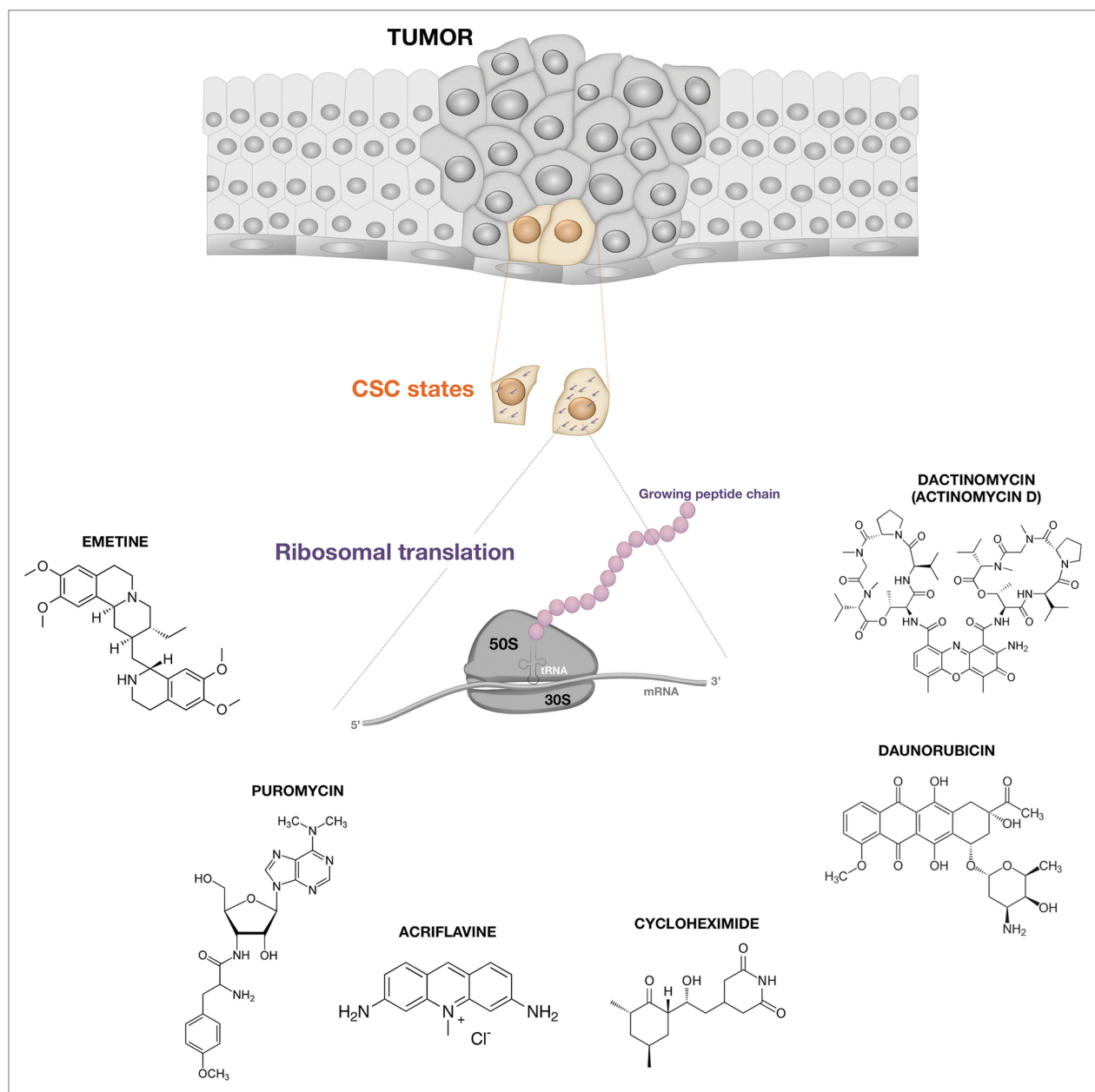


Figure 3. Inhibitors of ribosomal protein synthesis: (A) novel strategy to eradicate CSC traits in tumor tissues. Biologically aggressive, treatment-resistant breast cancer subtypes enriched for stem cell-like properties exhibit exacerbated chemosensitivities to antibiotics directly targeting active sites of the ribosome, such as emetine, puromycin and cycloheximide; inhibitors of ribosome biogenesis such as dactinomycin; ribotoxic stress agents such as daunorubicin, and indirect inhibitors of protein synthesis such as acriflavine. The repurposing of these old/existing microbicides and the development of second-generation inhibitors of ribosomal translation might constitute a valuable strategy to eradicate CSC traits in tumor tissues.

of other breast cancer subtypes (e.g., Luminal A/B, HER2-enriched) were not included in the sensitivity screen, it is notable that when the same Biolog Phenotype Microarray was used to profile HER2-enriched SKBR3 cells, reagents such as berberine chloride, azathioprine, celastrol, gossypol, miltefosine, and etoposide, were found to have the largest growth impact on the cell line.²⁷ It is therefore reasonable to assume that an intrinsic hypersensitivity to antimicrobial inhibitors of protein synthesis might occur in biologically aggressive and chemoresistant claudin-low and basal-like breast cancer cells.

Cellular translation is receiving increasing attention in anti-cancer therapy, with key translation regulatory factors such as ribosomes emerging as feasible targets.^{28,29} In this scenario, drug repurposing can circumvent the high cost of drug discovery and development, the high failure rates and the long duration to develop novel treatments.^{30,31} Using Phenotype MicroArrays, which enables quantitative measurements of thousands of cellular phenotypes at the same time, we show that breast cancer subtypes enriched for stem cell-like properties display exacerbated chemical sensitivities to microbicides that target ribosomes and/or inhibit protein synthesis (Fig. 3). These findings suggest that classical anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics, such as emetine, puromycin or acriflavine, could be used in combination with the currently used conventional cytotoxic chemotherapy in the treatment of claudin-low and basal-like breast carcinomas. Moreover, our ever-growing mechanistic understanding of ribosome functioning might guide the design of future small molecule inhibitors to target eukaryotic translation, which might be closely involved with the acquisition of molecular and functional traits of CSCs. As exemplified for the anti-protozoal alkaloid emetine, now repurposed as an anti-malarial based on the elucidation of how emetine binds to the ribosome,²⁵ and which has already been shown to selectively inhibit glioblastoma stem cell-enriched cultures,³² it might be possible for drug manufacturers to chemically modify natural antibiotics to further enhance their potency and specificity as

translation inhibitors capable of eradicating CSC traits in tumor tissues.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Kenneth McCreath for the support during editing of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Grant SAF2012–38914), Plan Nacional de I+D+I, Spain and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (Grant 2014 SGR229), Departament d'Economia i Coneixement, Catalonia, Spain to Javier A. Menendez.

References

- Lamb R, Harrison H, Smith DL, Townsend PA, Jackson T, Ozsvári B, Martínez-Outschoorn UE, Pestell RG, Howell A, Lisanti MP, et al. Targeting tumor-initiating cells: Eliminating anabolic cancer stem cells with inhibitors of protein synthesis or by mimicking caloric restriction. *Oncotarget* 2015 Feb 10. [Epub ahead of print].
- Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:2813-20; PMID:18539959; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3931>
- Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Semin Cancer Biol*. 2012; 22:396-403; PMID:22554795; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.001>.
- Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin Chem* 2013; 59:168-79; PMID:23220226; <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2012.184655>.
- Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501:328-37; PMID:24048065; <http://dx.doi.org/10.1038/nature12624>.
- Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat Rev Drug Discov* 2014; 13:497-512; PMID:24981363; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd4253>.
- Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov* 2015; 5:22-4; PMID:25583800; <http://dx.doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0788>.
- Heiser LM, Sadanandam A, Kuo WL, Benz SC, Goldstein TC, Ng S, Gibb WJ, Wang NJ, Ziyad S, Tong F, et al. Subtype and pathway specific responses to anti-cancer compounds in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:2724-9; PMID:22003129; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1018854108>.
- Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, Harrell JC, Roman E, Adamo B, Troester M, et al.

Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 142:237-55; PMID:24162158; <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-013-2743-3>.

- Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* 2011; 5:5-23; PMID:21147047; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2010.11.003>.
- Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JL, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12: R68; PMID:20813035; <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2635>.
- Morel AP, Hinkal GW, Thomas C, Fauvet F, Courtois-Cox S, Wierinckx A, Devouassoux-Shisheboran M, Treilleux I, Tissier A, Gras B, et al. EMT inducers catalyze malignant transformation of mammary epithelial cells and drive tumorigenesis towards claudin-low tumors in transgenic mice. *PLoS Genet* 2012; 8: e1002723; PMID:22654675; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002723>.
- Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JL, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:13820-5; PMID:19666588; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905718106>.
- Chandriani S, Frengen E, Cowling VH, Pendergrass SA, Perou CM, Whitfield ML, Cole MD. A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One* 2009; 4:e6693; PMID:19690609; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006693>.
- Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, Wallace TA, Issa HJ, Zhou M, Killian JK, et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest* 2014; 124:398-412; PMID:24316975; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI71180>.
- Liu JC, Voisin V, Wang S, Wang DY, Jones RA, Datti A, Uehling D, Al-awar R, Egan SE, Bader GD, et al. Combined deletion of Pten and p53 in mammary epithelium accelerates triple-negative breast cancer with dependency on eEF2K. *EMBO Mol Med* 2014; 6:1542-60; PMID:25330770; <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201404402>.
- Ghosh S, Varela L, Sood A, Park BH, Lotan TL. mTOR signaling feedback modulates mammary epithelial differentiation and restrains invasion downstream of PTEN loss. *Cancer Res* 2013; 73:5218-31; PMID:23774212; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0429>.
- Jönsson G, Staaf J, Olsson E, Heidenblad M, Vallon-Christersson J, Osoegawa K, de Jong P, Oredsson S, Ringnér M, Höglund M, et al. High-resolution genomic profiles of breast cancer cell lines assessed by tiling BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; 46:543-58; PMID:17334996; <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.20438>.
- Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, Lopez-Bonet E, Brunet J, Menendez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos)CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397:27-33; PMID:20470755; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.041>.
- Oliveras-Ferreros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martínez MC, Cufí S, Del Barco S, Bernado L, Brunet J, López-Bonet E, Menendez JA. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to

- 395 trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol* 2010;37:669-78; PMID:20664936.
21. Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufi S, Torres-Garcia VZ, Sauri-Nadal T, Barco SD, Lopez-Bonet E, Brunet J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 407:412-9; PMID:21402055; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.039>.
- 405 22. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Vellon L, Menendez JA. Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle* 2011 Nov 15;10:3871-85; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.10.22.17976>.
- 410 23. Cufi S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Dorca J, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget* 2012;3:395-8; PMID:22565037.
- 415 24. Martin-Castillo B, Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufi S, Moreno JM, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martín ÁG, López-Bonet E, Menendez JA. Basal/HER2 breast carcinomas: integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle* 2013; 12:225-45; PMID:23255137; <http://dx.doi.org/10.4161/cc.23274>.
25. Wong W, Bai XC, Brown A, Fernandez IS, Hanssen E, Condron M, Tan YH, Baum J, Scheres SH. Cryo-EM structure of the Plasmodium falciparum 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *Elife* 2014; 3; <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03080>.
26. Sauter KA, Wood LJ, Wong J, Iordanov M, Magun BE. Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* 2011; 11:1008-16; PMID:21464611; <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.11.12.15540>.
27. Parmar N, Wetton N, Alvarado S, Kennedy S. Profiling of human normal and cancer cell lines using phenotype microarray analysis. *FASEB J* 2014; 28:613.5.
28. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:254-66; PMID:20332778; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2824>.
29. van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:301-9; PMID:20332779; <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2819>.
30. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:673-83; PMID:15286734; <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1468>.
31. Vazquez-Martin A, López-Bonet E, Cufi S, Oliveras-Ferraros C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Repositioning chloroquine and metformin to eliminate cancer stem cell traits in premalignant lesions. *Drug Resist Updat* 2011; 14:212-23; PMID:21600837; <http://dx.doi.org/10.1016/j.drug.2011.04.003>.
32. Visnyei K, Onodera H, Damoiseaux R, Saigusa K, Petrosyan S, De Vries D, Ferrari D, Saxe J, Panosyan EH, Masterman-Smith M, et al. A molecular screening approach to identify and characterize inhibitors of glioblastoma stem cells. *Mol Cancer Ther* 2011; 10:1818-1828; PMID:21859839; <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0268>.

DISCUSIÓN GENERAL

En mujeres con cáncer de mama HER2+ temprano, el uso del anticuerpo monoclonal anti-HER2 trastuzumab en combinación con la quimioterapia estándar reduce el riesgo de recurrencia en casi un 50% (Perez y cols., 2014; Romond y cols., 2005). Sin embargo, no todos los tumores de mama HER2+ muestran el mismo beneficio a la terapia con trastuzumab si se tiene en cuenta el elevado número de pacientes que recidivan. En la actualidad, la selección de pacientes susceptibles de recibir terapias anti-HER2 en el entorno adyuvante y neoadyuvante del cáncer de mama temprano se basa exclusivamente en los criterios indicativos de la sobre-expresión de HER2, es decir, una expresión inmunohistoquímica de 3+ para la proteína HER2 o amplificación del gen HER2 por FISH (Wolff y cols., 2007, 2013).

Firmas pronósticas y predictivas en tumores HER2+ tempranos. Desde una perspectiva clínica, sería de gran utilidad poder disponer de biomarcadores capaces de identificar a aquellas pacientes que no se beneficiarán significativamente de las terapias basadas en trastuzumab, lo que podría permitir el empleo de otras estrategias terapéuticas. Un biomarcador predictivo capaz de identificar *ab initio* un subgrupo de pacientes con tumores HER2+ particularmente resistentes a trastuzumab, sería especialmente atractivo en el entorno adyuvante de la enfermedad, donde no existe la posibilidad de evaluar la respuesta del tumor (p. ej., cambios en el tamaño tumoral) y, por tanto, la eficacia de una determinada terapia. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha podido caracterizar ningún marcador molecular o clínico, incluyendo el propio HER2, que sea predictivo del beneficio de trastuzumab en la adyuvancia del cáncer de mama HER2+ (Moreno-Aspitia y cols., 2013; Paik y cols., 2008; Perez y cols., 2010, 2013). El análisis retrospectivo de muestras tumorales procedentes de ensayos clínicos con el mayor número de pacientes tratados con trastuzumab adyuvante, no ha sido capaz de caracterizar a día de hoy un biomarcador o la firma de biomarcadores que puedan identificar *a priori* el subgrupo de pacientes HER2+ que no se beneficiarán de la terapia con trastuzumab (Gianni y cols., 2011; Pogue-Geile y cols., 2015).

Las firmas de expresión génica de las que disponemos en la actualidad no son capaces de distinguir subgrupos de pacientes HER2+ “respondedores” o “no respondedores” a la terapia con trastuzumab. En este sentido, Pogue-Geile y cols. (2013), mediante el

análisis retrospectivo de los datos de expresión génica de 1.500 muestras de tumores primarios, desarrollaron un modelo predictivo de ocho genes capaz de estratificar los tumores HER2+ en tres subgrupos diferentes según el beneficio obtenido tras el tratamiento con trastuzumab: “*extraordinario*”, “*moderado*” y “*no aparente*”. Sin embargo, en la práctica clínica habitual sería complejo establecer puntos de corte con dicho modelo predictivo, lo que dificulta la validación de esta firma de ocho genes; en realidad, su aplicación arbitraria podría dar lugar a una incorrecta clasificación de los pacientes HER2+ y a recomendaciones inapropiadas de tratamiento (Krop y Burstein, 2013). Utilizando perfiles moleculares para investigar el pronóstico y la respuesta a terapia de tumores HER2+, Staaf y cols. (2010) identificaron una firma pronóstica y predictiva de 158 genes denominada HDPP (del inglés *HER2-derived prognostic predictor*). La firma HDPP mejoraba significativamente la estratificación del buen o mal pronóstico tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de metástasis exclusivamente en los subtipos moleculares “HER2-enriquecido” y “basal” pero no demostró valor pronóstico alguno en los subtipos “Luminal A” y “Luminal B”. Aunque, obviamente, la aplicabilidad clínica de esta firma genética está restringida por su naturaleza retrospectiva y por haber empleado pacientes que no habían recibido terapia basada en trastuzumab, es interesante señalar que la validación posterior de la firma HDPP fue capaz de predecir resistencia a trastuzumab en un pequeño grupo de pacientes HER2+ tratados con trastuzumab pre-operatorio (Harris y cols., 2007b). Aunque el tamaño de la muestra del estudio de Harris y cols. (2007b) no era lo suficientemente grande para poder establecer conclusiones definitivas, “*los tumores que sobre-expresan HER2 con un fenotipo de tipo basal*” parecían ser más proclives a presentar resistencia *de novo* al tratamiento pre-operatorio con trastuzumab.

Tumores HER2+ y de tipo basal: ¿Dos entidades moleculares mutuamente excluyentes? Aunque los primeros retratos moleculares de cáncer de mama con micromatrices de ADN sugirieron que los carcinomas de mama con un fenotipo basal no poseían amplificación de HER2 (Perou y cols., 2000), los análisis subsiguientes mostraron la tendencia a incluir tumores HER2 amplificados muy próximos o incluso dentro de la subclase de tipo “basal” (Bertucci y cols., 2004; Sorlie y cols., 2001, 2003; Sotiriou y cols., 2003). La co-expresión de citoqueratinas basales con la amplificación

del oncogén HER2 ha sido observada en algunos tumores de mama (Laakso y cols., 2005, van de Rijn y cols., 2002) y en la línea celular HER2-positiva JIMT1 con resistencia primaria a trastuzumab (Tanner y cols., 2004). Estudios previos morfológicos e inmuno-histológicos (Bertucci y cols., 2004; Bhargava y cols., 2010; Laakso y cols., 2006; Liu y cols., 2008; Oliveras-Ferraros y cols., 2010) han demostrado que un subgrupo de tumores HER2+ mostraban características clásicamente adscritas a tumores de tipo basal, incluyendo: Pobre grado de diferenciación, alto grado, necrosis geográfica, márgenes con tendencia a invasión, reorganización sincitial de células tumorales de tipo “lazo” o “guirnalda”, metaplasia escamosa, infiltrados linfocíticos estromales, alto índice mitótico y una elevada positividad de mutaciones en p53. Aunque en algunas ocasiones estos carcinomas de mama de fenotipo “basal-HER2+” muestran inmunoreactividad para el marcador de citoqueratina epitelial basal CK5/6 de forma uniforme o casi uniforme, lo que mimetiza el patrón puro observado habitualmente en los carcinomas de mama de tipo basal, en la mayoría de las ocasiones los tumores “basal-HER2+” muestran heterogeneidad tumoral respecto a la positividad CK5/6 de tipo “tablero de ajedrez”. Por tanto, más allá de los estudios de perfil de expresión génica basados en micromatrices, el subtipo denominado “basal-HER2+” ha sido también identificado mediante el empleo de marcadores habitualmente empleados en los servicios de anatomía patológica durante la clasificación inmunohistoquímica de los distintos subtipos de cáncer de mama.

Cuando Laakso y cols. (2006) estratificaron los cánceres de mama de tipo basal según la expresión inmunohistoquímica de las CKs basales CK5 y CK14, aquellos tumores con expresión baja/moderada de CKs basales tenían tendencia a presentar sobre-expresión de HER2. De forma similar, Liu y cols. (2008) describieron un pequeño grupo de tumores con receptores hormonales negativos que expresaban simultáneamente HER2 y marcadores basales. Ambos estudios demostraron que las pacientes con el subtipo mixto “basal-HER2+” tenían significativamente peor pronóstico que aquellas con tumores HER2+ o de tipo basal. Harris y cols. (2007b) demostraron que un fenotipo particular de los tumores HER2+ que sobre-expresaba genes asociados con el fenotipo basal, incluyendo una expresión elevada de CKs basales (CK5/6, CK14, CK15 y CK17), era más frecuente en el grupo de pacientes “no-respondedores” que habían

recibido trastuzumab pre-operatorio que en el grupo de “respondedores”. Bagaria y cols. (2012), siguieron una estrategia similar para determinar las características clínico-patológicas y la supervivencia global de tres grupos distintos de carcinoma de mama HER2+ definidos por inmunohistoquímica, y observaron que al correlacionar tumores “luminal-HER2+” (RE-positivo y CK basal-negativo), tumores “HER2+” (RE-negativo y CK basal-negativo) y tumores “basal-HER2+” (RE-negativo y CK basal-positivo), el subtipo “basal-HER2+” se asociaba de manera significativa con un peor pronóstico.

Aunque los datos publicados sobre el fenotipo “basal-HER2+” son limitados, la asunción de que los cánceres de mama de tipo “basal” y “HER2+” son entidades mutuamente excluyentes ha comenzado a ponerse en duda en los últimos años. En este sentido, los resultados aportados por nuestro estudio respaldan definitivamente la idea de que el fenotipo “basal-HER2+” distingue un subgrupo clínico de carcinomas de mama biológicamente agresivos que no se beneficia del tratamiento con terapias basadas en trastuzumab.

El fenotipo “basal-HER2+”: Valor pronóstico en tumores de mama HER2+.

Nuestro trabajo confirma que el fenotipo “basal-HER2+”, definido exclusivamente por la co-expresión de CK5/6 basales en tumores que sobre-expresan o amplifican HER2, se asocia con una enfermedad agresiva y tiene un impacto negativo en la supervivencia de las pacientes. En nuestra serie de 152 pacientes HER2+ no se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad entre las pacientes con tumores positivos para el RE (los denominados “luminal-HER2+”) y aquellas con tumores negativos para el RE (los denominados “HER2+”). Sin embargo, el fenotipo “basal-HER2+” se asoció significativamente con una menor supervivencia global en el análisis univariante. Tras la inclusión en el análisis multivariante de importantes variables pronóstico como el tamaño tumoral al diagnóstico, la presencia del fenotipo “basal-HER2+”, pero no el estado del RE, predijo no solo una peor supervivencia global sino también, de forma significativa, una peor supervivencia libre de enfermedad cuando se tuvo en cuenta una tinción positiva de CK 5/6 $\geq 10\%$ en las secciones de tejido de cáncer de mama HER2+.

Muy recientemente, Chung y cols. (2015) han descrito que el 37% de 97 pacientes con cáncer de mama HER2+ (estadios I a III) expresaban al menos un marcador basal (CK5/6, CK14, EGFR). Cuando se tuvo en consideración la expresión de marcadores individuales, los autores identificaron un 15% de CK5/6/HER2+, un 8% de CK14+/HER2+ y un 34% de EGFR+/HER2+. Un estudio previo del mismo grupo puso de manifiesto la presencia del fenotipo “basal-HER2+” en un 9% de 131 tumores HER2+ cuando se tuvo en consideración la expresión bien de CK5/6 o de CK14 (Bagaria y cols., 2012). En series consecutivas de mayor tamaño (n=713) con tumores de mama invasivos con receptores hormonales negativos, Liu y cols. (2008) pusieron de manifiesto la presencia de hasta un 8% de casos “basal-HER2+” que co-expresaban HER2 y alguno/s de los marcadores basales CK5/6, CK14 o EGFR. En nuestro trabajo de investigación hemos empleado una serie consecutiva de 152 carcinomas de mama primarios invasivos HER2+ de tipo ductal, en la que hemos encontrado un 16% de casos que presentaban un fenotipo “basal-HER2+”, el cual fue establecido únicamente en base a la presencia/ausencia de la expresión de CK5/6 como marcador basal (Martín-Castillo y cols., 2015a).

Más allá de las evidencias procedentes de estudios inmunohistoquímicos, es importante señalar que, mediante el análisis exhaustivo de los datos moleculares derivados de ADN, ARN y proteínas existentes en dos grandes bases de datos públicas (ATLAS y METABRIC) procedentes de más de 1.700 pacientes no tratadas con trastuzumab, Prat y cols. (2014) han confirmado que los carcinomas de mama clínicamente HER2+ (cHER2+) tienen una frecuencia del 14,1% del subtipo intrínseco de tipo basal. Un porcentaje similar (14,4%) de tumores cHER2+ tiene lugar en el subtipo intrínseco de tipo basal. Dentro de los tumores cHER2+, la expresión de la proteína y del gen HER2 fue significativamente superior no sólo en el subtipo “HER2-enriquecido” sino también en el subtipo “basal” cuando se comparaba con los subtipos de cáncer de mama “Luminal A” y “Luminal B”. Todos estos estudios respaldan los hallazgos mostrados en esta tesis: los pacientes con tumores de mama “basal-HER2+” muestran la peor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad entre todos los subtipos HER2+. Es decir, el estado cHER2+ no parece añadir un valor pronóstico independiente al proporcionado por el subtipo intrínseco de tipo basal en el cáncer de

mama. Algunos estudios han sugerido que el pronóstico de los tumores basal-HER2+ podría ser incluso peor que el de los tumores de mama de tipo basal cuando estos fueron definidos en base a criterios inmunohistoquímicos pero no moleculares (Liu y cols., 2008).

El fenotipo “basal-HER2+”: Valor predictivo en tumores de mama HER2+. En un trabajo previo, nuestro grupo analizó la respuesta intrínseca a trastuzumab en las 51 líneas celulares de cáncer de mama incluidas en la colección de cáncer de mama del Lawrence Berkeley National Laboratory (Neve y cols., 2006). Tras clasificar las líneas de cáncer de mama HER2+ como sensibles o refractarias a trastuzumab *ab initio*, observamos que la sensibilidad intrínseca a trastuzumab estaba restringida a las líneas celulares de cáncer de mama de tipo luminal-HER2+, mientras que todas las líneas celulares de tipo basal-HER2+ exhibían una resistencia intrínseca a trastuzumab (Oliveras-Ferraros y cols., 2012). Dado que en la actualidad no es posible caracterizar *a priori* los distintos subgrupos biológicos de cáncer de mama HER2+ asociados con resistencia a las terapias adyuvante/neoadyuvante basadas en trastuzumab mediante el uso clínico rutinario de micromatrices de ADN para firmas predictivas tales como HDPP, la asociación entre la presencia de un subtipo “basal-HER2+” y la resistencia primaria a trastuzumab en líneas celulares de cáncer de mama *in vitro* junto con el descubrimiento del valor pronóstico del fenotipo “basal-HER2+” *in vivo*, nos permitió hipotetizar que el perfil de CKs basales en carcinomas de mama cHER2+ podría tener también un valor predictivo. Es decir, la identificación basada en inmunohistoquímica de un fenotipo “basal-HER2+” podría ser capaz de clasificar el beneficio de las terapias adyuvantes y neoadyuvantes basadas en trastuzumab en pacientes cHER2+.

La simple presencia de la expresión de CK5/6 usando un punto de corte de 10% permitió reclasificar los tumores de mama cHER2+ en subclases de tumores a los que denominamos “basal 1-HER2+” (en los cuales <10% de las células tumorales muestran una tinción positiva de CK5/6) -los cuales parecen ser indistinguibles de los tumores denominados “HER2+” en cuanto a su pronóstico- y la subclase de tumores denominada “basal 2-HER2+”, compuesta de tumores clínicamente agresivos (en los cuales $\geq 10\%$ de las células tumorales muestran una tinción positiva de CK5/6) y que

no se benefician de terapias adyuvantes y neoadyuvantes con trastuzumab. Aún reconociendo las limitaciones de nuestro estudio si se tienen en cuenta lo reducido de la muestra (n=152), su naturaleza exploratoria y el hecho de que los datos de pacientes que recibieron trastuzumab eran limitados en cuanto al número de pacientes (aproximadamente un 45% del total de pacientes HER2+; n=69) y a la madurez de los datos (la mediana de seguimiento fue de 4 años para las pacientes tratadas con trastuzumab adyuvante), el hecho de que el uso de trastuzumab y quimioterapia no difiriera significativamente entre pacientes con tumores “HER2+” y “basal-HER2+” junto con la fuerte asociación estadística entre el fenotipo “basal-HER2+” y una peor supervivencia y tiempo de recaída inferior tras el tratamiento con trastuzumab, sugiere que la identificación inmunohistoquímica del fenotipo “basal-HER2+” podría ser de utilidad como marcador predictivo de resistencia primaria a trastuzumab.

Más allá de confirmar la idea de la existencia de un fenotipo “basal-HER2+” como un subgrupo de carcinomas de mama cHER2+ intrínsecamente agresivo, nuestro trabajo demuestra por primera vez que los pacientes con el fenotipo de cáncer de mama “basal-HER2+” no parecen beneficiarse de la adición de trastuzumab a la quimioterapia. Así, en la sub-cohorte de 69 pacientes HER2+ tratadas con terapias adyuvante y neoadyuvante basadas en trastuzumab, la presencia del fenotipo “basal-HER2+” fue el único marcador pronóstico independiente hallado en el análisis multivariante capaz de predecir significativamente el fallo al tratamiento. Chung y cols. (2015) han confirmado que la co-expresión de CK5/6 y EGFR son factores predictivos de peor pronóstico en las pacientes con cáncer de mama HER2+ tratadas con trastuzumab. Dadas las asociaciones conocidas entre la presencia de un subtipo basal o HER2+ y una elevada respuesta a la quimioterapia (Rouzier y cols., 2005), las mayores tasas de recurrencia observadas en las pacientes con fenotipo “basal-HER2+” que recibieron trastuzumab y quimioterapia neo/adyuvante podría explicarse como la capacidad de las proteínas basales para determinar de manera específica la resistencia *de novo* a trastuzumab. Chung y cols. (2015) no pudieron encontrar un valor predictivo significativo dependiente de los niveles de expresión de CK5/6; nuestro estudio, sin embargo, pudo establecer que el perfil de expresión basado en CK5/6

usando un punto de corte de un 10% de positividad es capaz de predecir la resistencia primaria a trastuzumab (ver Figura 6, página 16 del artículo “*Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer*” –sección de Resultados-).

Mecanismos moleculares de resistencia a trastuzumab en tumores “basal-HER2+”. Se han descrito numerosos mecanismos moleculares implicados en la resistencia a trastuzumab relacionados con las CMTs. Por ejemplo, la sobre-expresión del marcador CD44, se sabe induce la pérdida o bloquea el sitio de unión a trastuzumab en el dominio extracelular de HER2 (Pályi-Krekky y cols., 2007). La sobre-expresión de marcadores de CMTs como CXCR4, integrina b1 o Notch-1 (Korkaya y Wicha, 2010; Lesniak y cols., 2009; Osipo y cols., 2008), da lugar a la activación de vías alternativas que eluden el bloqueo de la señal de HER2 inducido por trastuzumab y a la activación de mediadores de supervivencia como el inhibidor de la apoptosis survivina (Oliveras-Ferraro y cols., 2011). Estudios previos, algunos procedentes de nuestro grupo de investigación (Chung y cols., 2015; Cufi y cols., 2012; Oliveras-Ferraro y cols., 2010a, 2010b, 2011, 2012; Sarrio y cols., 2012), han descrito que las líneas celulares de tipo “basal-HER2+” que muestran resistencia intrínseca a trastuzumab co-expresan simultáneamente la mayoría de mecanismos de resistencia conocidos a trastuzumab. Los mediadores clave de estos mecanismos de resistencia están íntimamente relacionados con los marcadores y vías de señalización habitualmente presentes en las células de tipo CMT (Bedard y cols., 2009) (ver Figura 1, página 3 del artículo “*Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas*” –sección de Resultados-).

Dado que el enriquecimiento en características propias de las células de tipo CMT es un distintivo molecular bien conocido de la agresividad intrínseca de los tumores de mama de tipo basal (Hennessey y cols., 2009; Honeth y cols., 2008; Liu y cols., 2013; Ricardo y cols., 2011; Storci y cols., 2008), es razonable proponer un nexo de unión entre la presencia de marcadores basales (p.ej. CK5/6), un incremento en la presencia de células de tipo CMT, y la resistencia primaria a trastuzumab en los tumores “basal-HER2+”.

De hecho, es razonable sugerir que la subclasificación de los tumores HER2+ en base a su expresión de CK basales es un algoritmo inmunohistoquímico que informa de la presencia subyacente de firmas genéticas de tipo CMT en los tumores basal-HER2+, lo que les conferiría un peor pronóstico y resistencia intrínseca a trastuzumab. Sin embargo, sabemos que la eficacia de trastuzumab reside, al menos en parte, en su capacidad de alcanzar directamente e inhibir las CMTs en los tumores HER2+ (Korkaya y cols., 2008, 2013; Magnifico y cols., 2009). Más aún, la proteína HER2 parece ser en sí misma “el director de orquesta” de las CMTs en el cáncer de mama, incluso en aquellos tumores que carecen de la sobre-expresión/amplificación de HER2 (Ithimakin y cols., 2013; Korkaya y cols., 2013), lo cual podría explicar la inesperada eficacia del tratamiento adyuvante con trastuzumab en el cáncer de mama cHER2-negativo (Paik y cols., 2008; Perez y cols., 2010). Por tanto, si la base molecular para la eficacia clínica de trastuzumab es a través de un proceso directamente relacionado con la eliminación de las CMTs, la manera más intuitiva de resolver este escenario es la propuesta de la existencia *a priori* de resistencia primaria de las CMTs HER2+ única y exclusivamente en los carcinomas de mama basal-HER2+, pero no en otros fenotipos HER2+ (Oliveras-Ferraros y cols., 2010; Valabrega y cols., 2011).

De forma alternativa, cuando se tiene en cuenta la plasticidad de los estados celulares de CMT en el cáncer de mama (Liu y cols., 2013), podría proponerse que solamente ciertos estados de CMT, pero no otros, son sensibles a trastuzumab. En este segundo escenario, la acumulación intrínseca de estados de CMT resistentes a trastuzumab o una mayor proclividad a generar dichos estados, explicaría el peor pronóstico y resistencia primaria a terapias neo/adyuvantes basadas en trastuzumab en los tumores cHER2+ con fenotipo basal. En este sentido, esta tesis propone un modelo de predicción de respuesta a trastuzumab de los tumores cHER2+ que integra las características moleculares de los subtipos intrínsecos (es decir, luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal, y bajo en claudina) con el conocimiento más actual de la biología de las CMTs en el cáncer de mama (Martín-Castillo y cols., 2015b).

Subtipos moleculares intrínsecos, estados de CMTs y tumores cHER2+:
Un nuevo modelo de integración del valor pronóstico y predictivo de HER2 en el cáncer de mama. Las CMTs del cáncer de mama parecen existir en dos tipos diferentes, pero reversibles y por lo tanto intercambiables, de estados celulares: uno de tipo epitelial y otro de tipo mesenquimal (Liu y cols., 2013). El estado epitelial de las CMTs del cáncer de mama se caracteriza por la expresión de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Douville y cols., 2009; Korkaya y cols., 2008). El estado mesenquimal de las CMT del cáncer de mama se caracteriza por el inmunofenotipo $CD44^+CD24^{-/bajo}$ (Al-Hajj y cols., 2003; Dontu y cols., 2005; Fillmore y cols., 2008). Es importante señalar que, mientras que estas dos poblaciones de CMTs pueden encontrarse a través de todos los subtipos moleculares de cáncer de mama, su proporción varía significativamente entre ellos (Liu y cols., 2013). Así, el número de CMTs epiteliales que expresan ALDH es significativamente superior en los subtipos de cáncer de mama HER2-enriquecido y luminal, mientras que los subtipos de tipo basal y bajo en claudina están enriquecidos en CMTs mesenquimales $CD44^+CD24^{-/bajo}$. Teniendo en cuenta que los diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama se caracterizan por sus distintos perfiles de mutaciones, es razonable sugerir que una combinación única de factores genéticos, epigenéticos y probablemente también microambientales contribuirán finalmente a la predominancia de cada estado de CMT en un determinado subtipo clínico de tumores cHER2+.

Nuestro modelo propone que, al superponer cada subtipo molecular de cáncer de mama a través de un *continuum* de tumores cHER2+, donde un extremo está enriquecido con CMTs epiteliales ALDH+ (sensibles a trastuzumab) en los tumores HER2-enriquecidos/cHER2+ y el otro extremo está enriquecido con CMTs mesenquimales $CD44^+CD24^{-/bajo}$ (resistentes a trastuzumab) en los tumores basal/cHER2+ y bajo en claudina/cHER2+, el enriquecimiento diferencial de CMTs epiteliales *versus* CMTs mesenquimales podría explicar el comportamiento clínico y la eficacia de trastuzumab en cada subtipo mixto de cHER2+.

Por un lado, el mal pronóstico de los cánceres de mama que co-expresan ALDH y HER2 (Ginestier y cols., 2007; Kakarala y cols., 2008) podría explicarse por el enriquecimiento de CMTs epiteliales que expresan ALDH en los subtipos HER2-enriquecido y HER2-luminal. Simultáneamente, dado que la eficacia de trastuzumab parece relacionarse directamente con su capacidad de reducir drásticamente las poblaciones de CMTs epiteliales definidas por una expresión elevada de ALDH y los niveles más elevados de HER2 (Korkaya y cols., 2008), es esperable que los fenotipos de cáncer de mama HER2-enriquecido/cHER2+ y luminal/cHER2+ sean los fenotipos mixtos que se benefician más significativamente del tratamiento con trastuzumab. Sin embargo, si la población de CMTs epiteliales ALDH+ es significativamente superior en los subtipos HER2-enriquecido/cHER2+ y luminal B/cHER2+ en comparación al subtipo luminal A/cHER2+, este modelo podría incluso explicar porqué una minoría de pacientes con cáncer de mama cHER2+ tiene un pronóstico excelente incluso en la ausencia de tratamiento (Alexe y cols., 2007; Chia y cols., 2008). Por otro lado, el enriquecimiento de CMTs mesenquimales $CD44^+CD24^{-/bajo}$ podría contribuir al comportamiento clínico altamente agresivo del fenotipo basal/cHER2+ y bajo en claudina/cHER2+ dado que las células $CD44^+CD24^{-/bajo}$ incrementarán la capacidad de invasión, migración y metástasis de tumores cHER2+ pertenecientes a estos subtipos (Chekhun y cols., 2015; Idowu y cols., 2012). De forma simultánea, dado que el enriquecimiento de características mesenquimales confiere una elevada resistencia a las acciones anti-tumorales de trastuzumab (Cufi y cols., 2012; Martín-Castillo y cols., 2013; Oliveras-Ferraro y cols., 2010, 2012), los fenotipos de cáncer de mama basal/cHER2+ y bajo en claudina/cHER2+ serán los que menos se beneficiarán de tratamientos neo/adyuvantes basados en trastuzumab según este modelo.

Nuestro modelo de eficacia primaria de trastuzumab determinada por el carácter epitelial *versus* mesenquimal de las CMTs en el cáncer de mama cHER2+ incorpora también la idea de que el fenómeno de la TEM (y su proceso inverso, la TME) permiten: 1.) la transición bi-direccional de las CMTs entre un estado de tipo epitelial (ALDH+) sensible a trastuzumab y un estado de tipo mesenquimal ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) resistente a trastuzumab; 2.) la adquisición de un estado mesenquimal de tipo CMT ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) resistente a trastuzumab por parte de células epiteliales diferenciadas.

Por un lado, estas transiciones reversibles dotan de una capacidad plástica a los tumores cHER2+ para la invasión de tejidos, diseminación y crecimiento en los lugares metastásicos, lo que podría determinar el pronóstico de cada subtipo mixto de cHER2+. Por otro lado, la capacidad de las CMTs y del tejido tumoral diferenciado para perder un estado epitelial sensible a trastuzumab y adquirir un estado mesenquimal resistente al mismo, podría proporcionar a los tumores cHER2+ de diversos grados de plasticidad en su respuesta primaria a trastuzumab, determinando así el valor predictivo de cada subtipo cHER2+. De nuevo, en todo caso, es importante indicar que el grado de plasticidad que poseen las CMTs y el tejido tumoral diferenciado para transitar entre los estados epitelial y mesenquimal es esperable que varíe significativamente entre cada subtipo. Los tumores de mama cHER2+ de tipo luminal y HER2-enriquecido serán menos propensos a la pérdida de estados celulares epiteliales, mientras que el subtipo basal/cHER2+ será más propenso a adquirir estados celulares mesenquimales. En realidad, nuestro modelo es capaz de acomodar fácilmente los datos actualmente disponibles en torno a la existencia de resistencia a trastuzumab inducida por el fenómeno de la TEM (Oliveras-Ferraro y cols., 2012; Prat y cols., 2010, 2011, 2013).

Estados epiteliales y mesenquimales de las CMTs en la resistencia primaria y secundaria a trastuzumab en tumores cHER2+. JIMT-1 fue la primera línea celular comercializada derivada de una paciente HER2+ con resistencia intrínseca a trastuzumab, y está enriquecida de forma natural por un estado mesenquimal CD44⁺CD24^{-bajo}. Estudios previos de nuestro grupo de investigación demostraron que las células JIMT-1 basal/HER2+ refractarias a trastuzumab sufren cambios de marcadores de superficie mesenquimales a lo largo del tiempo (Oliveras-Ferraro y cols., 2010). Mientras que pases de cultivo tempranos de células JIMT-1 contienen aproximadamente un 10% de células con el inmunofenotipo CD44⁺CD24^{-bajo}, se observó que pases tardíos acumulan aproximadamente el 80% de células CD44⁺CD24^{-bajo}, presentando, por tanto, una identidad casi perfecta con el fenotipo CD44⁺CD24^{-bajo} que tiene lugar de forma constitutiva en el subtipo bajo en claudina HER2-negativo (Prat y cols., 2010, 2011, 2013). Asimismo, las células JIMT-1 basal/HER2+ recuperan su sensibilidad a trastuzumab mediante la conversión de estados mesenquimales CD44⁺CD24^{-bajo} a estados epiteliales de tipo CD24⁺ (Oliveras-Ferraro y cols., 2012).

Así, el silenciamiento del marcador mesenquimal SLUG fue suficiente para reducir drásticamente el porcentaje de células con un inmunofenotipo CD44⁺CD24^{-/bajo} refractario a trastuzumab. El bloqueo de SLUG en las células JIMT-1 basal/HER2+ aumenta significativamente el número de células epiteliales que expresan ALDH (observaciones no publicadas). Clínicamente, nuestros resultados han puesto de manifiesto que la simple reclasificación de los tumores HER2+ según los niveles de expresión de los factores de transcripción de la TEM y marcadores de CMTs, SLUG y TWIST, haciendo uso de una base de datos pública y *online* que proporciona datos de supervivencia y expresión de genes (Kaplan-Meier plotter), es suficiente para predecir significativamente una peor supervivencia libre de recaída y supervivencia libre de metástasis en la cohorte de pacientes HER2+/SLUG y HER2+/TWIST (ver Figura 7, página 17 del artículo “Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer” – sección de Resultados-).

La eliminación específica de células con el inmunofenotipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-/bajo} inducida por el anti-diabético metformina es capaz de revertir la resistencia primaria a trastuzumab en xenografts basal/HER2+ creciendo en ratones inmunodeprimidos (Cufi y cols., 2012), proporcionando la evidencia farmacológica de que el enriquecimiento relativo en células mesenquimales CD44⁺CD24^{-/bajo} determina la resistencia *de novo* a trastuzumab. En este sentido, diversos mecanismos moleculares que dan lugar a la reversión del fenotipo mesenquimal (p.ej. la supresión de la señalización intracelular inducida por TGF- β y MiR-200c [Bai y cols., 2014]) son capaces de revertir tanto la resistencia primaria a trastuzumab como la cascada de invasión-metástasis en tumores HER2+. Más aún, se ha observado que la resistencia adquirida a trastuzumab aparece cuando las células HER2+ cambian espontáneamente de un fenotipo luminal a un fenotipo bajo en claudina tras un fenómeno de TEM (Lesniak y cols., 2013), lo que sugiere que el fenotipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-/bajo} es un determinante clave y común de la resistencia primaria y secundaria a trastuzumab en tumores HER2+. En cualquier caso, la proclividad natural de adquirir un fenotipo TEM refractario a trastuzumab podría ser mayor en células HER2+ que, por ejemplo, pierden algún marcador epitelial clave tal como el receptor de estrógenos y E-cadherina.

Por el contrario, células HER2+ que expresan niveles elevados de marcadores típicos del fenotipo luminal serán más proclives a mantener un fenotipo de tipo epitelial sensible a trastuzumab. Por tanto, cuando contemplamos un *continuum* en los estados CMT de tipo epitelial y de tipo mesenquimal a través de los subtipos moleculares de cáncer de mama cHER2+ se pone de manifiesto que el fenómeno de la TEM es un mecanismo convergente que, cuando se activa, dirige tanto la resistencia a trastuzumab *de novo* (primaria) en el subtipo basal/cHER2+ como la adquirida (secundaria) en los subtipos luminales incluido el HER2-enriquecido.

Es significativo que tanto el enriquecimiento *de novo* en características TEM (un determinante de la resistencia primaria a trastuzumab en los tumores de mama basal/cHER2+) como la adquisición espontánea de dichas características (que puede constituir un determinante principal de resistencia adquirida a trastuzumab en tumores luminal/cHER2+ y HER2-enriquecido/cHER2+), comparten una disminución significativa de la expresión de HER2. Nuestro grupo de investigación demostró que el enriquecimiento espontáneo del fenotipo mesenquimal CD44⁺CD24^{-bajo} en cultivos de poblaciones celulares basal/HER2+ era coincidente con una disminución global en la expresión de HER2 (Oliveras-Ferraro y cols., 2010). Utilizando células de cáncer de mama de tipo luminal/HER2+, Lesniak y cols. (2013) describieron que la conversión espontánea a través de la TEM a un fenotipo CD44⁺CD24^{-bajo} refractario a trastuzumab se acompañaba de una disminución muy significativa en la expresión de HER2. Estos hallazgos pueden tener importantes implicaciones clínicas cuando se tiene en consideración las tasas de discordancia de la expresión de HER2 entre los tumores primarios y sus metástasis (Santinelli y cols., 2008), y también tras la terapia sistémica neoadyuvante basada en trastuzumab (Guarneri y cols., 2013; Hurley y cols., 2006). Es interesante señalar que las pacientes cHER2+ cuya enfermedad metastásica ha cambiado a un fenotipo HER2-negativo tienen un peor pronóstico global (Lower y cols., 2009), y que aquellas pacientes cHER2+ cuya enfermedad residual tras trastuzumab neoadyuvante pierde la sobre-expresión de HER2 tienen una supervivencia libre de recaída significativamente peor (Mittendorf y cols., 2009).

El hecho de que la supervivencia libre de recaída sea significativamente mejor en las pacientes cHER2+ con tumores que retienen la sobre-expresión de HER2 después del tratamiento con terapias basadas en trastuzumab implica que la negativización de HER2 se acompaña de un incremento de agresividad en la enfermedad residual. En este sentido, los tumores basal/cHER2+ raramente exhiben una uniformidad positiva para la expresión de citoqueratinas basales; en su lugar, muestran un patrón de expresión parcialmente positivo (“baso-luminal” [Laakso y cols., 2006]) que a menudo muestra una heterogeneidad intratumoral de tipo “tablero de ajedrez” (Oliveras-Ferraros y cols., 2010). Por tanto, un enriquecimiento de clones o de agrupaciones de células con un alto porcentaje de CMTs de fenotipo mesenquimal y con expresión disminuida de HER2 podría explicar tanto la baja respuesta de los tumores basal/cHER2+ a trastuzumab como el cambio en el estado de expresión de HER2 tras el tratamiento. Si un determinante principal de la resistencia adquirida a trastuzumab en los tumores luminal/ cHER2+ y HER2-enriquecido/cHER2+ es la existencia *de novo* del fenómeno de la TEM, la cual daría lugar a la aparición de agrupaciones de células o clones mesenquimales con un fenotipo CD44⁺CD24^{-/bajo}/HER2-bajo, la presión selectiva del tratamiento de trastuzumab podría dar lugar de forma similar a la emergencia de CMTs mesenquimales refractarias a trastuzumab, así como a un cambio en el estado de HER2 del tumor post-tratamiento. Futuros estudios clínicos deberán clarificar si la heterogeneidad intratumoral para las citoqueratinas basales y/o de marcadores convencionales de la TEM tiene un papel crucial en la relación entre el cambio en el estado de expresión de HER2 y la eficacia de trastuzumab y la supervivencia en las pacientes con cáncer de mama cHER2+.

Implicaciones terapéuticas de la heterogeneidad tumoral en la respuesta a trastuzumab. Dado que los distintos subtipos intrínsecos de cáncer de mama (es decir, luminal A, luminal B, HER2-enriquecido, basal y bajo en claudina) parecen retener su comportamiento biológico y características moleculares independientemente del estado de cHER2 (Prat y cols., 2014), se necesitan estudios prospectivos para evaluar si la superposición de cada subtipo de cáncer de mama intrínseco a lo largo del espectro de cáncer de mama cHER2+ podría generar un modelo predictivo a priori de respuesta a trastuzumab.

En este modelo, la agresividad asociada al subtipo basal confiere no sólo un peor pronóstico sino también una menor o nula eficacia de trastuzumab en las pacientes con cáncer de mama cHER2+. Contrariamente al modelo dicotómico actual (cHER2+ *versus* cHER2-), nuestro modelo propone que la simple reclasificación de los tumores cHER2+ basada en el empleo de marcadores basales (p.ej. CK5/6) podría informar de forma indirecta de su grado intrínseco de resistencia primaria a trastuzumab, lo que mejoraría significativamente el valor predictivo de cHER2+ en el cáncer de mama. En realidad, la misma superposición de los subtipos intrínsecos de cáncer de mama a través del *continuum* del cáncer de mama cHER2-negativo podría explicar la aparentemente paradójica actividad de trastuzumab en los tumores luminal/cHER2- y HER2-enriquecido/cHER2- (Paik y cols., 2008; Perez y cols., 2010), los cuales acumulan CMTs que sobre-expresan ALDH y son dependientes de HER2 pero no debido a su amplificación génica, y la ineficacia de trastuzumab en tumores basal/cHER2-, los cuales acumulan CMTs CD44⁺CD24^{-/bajo} HER2-independientes (Ithimakin y cols., 2013; Korkaya y cols., 2013). Dado que estudios clínicos recientes han demostrado que las células fuertemente ALDH+ muestran un fenotipo más agresivo, típico de las CMTs (Sjöström y cols., 2015), podría ser relevante evaluar si el biomarcador ALDH podría asociarse con la eficacia a trastuzumab de una forma dependiente de expresión en tumores cHER2+ (ver Figura 5, página 8 del artículo “*Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas*” –sección de Resultados-).

Trastuzumab constituye probablemente el único agente terapéutico disponible en la actualidad capaz de atacar simultáneamente la población celular epitelial HER2+ que conforma el grueso del tumor y las CMTs de tipo epitelial (ALDH+) en el cáncer de mama. Por tanto, el beneficio óptimo terapéutico del bloqueo de HER2 basado en trastuzumab se conseguiría cuando se produjese la reducción de ambas poblaciones HER2+ (el grueso del tumor y las CMTs epiteliales) en un determinado tumor cHER2+ (ver Figura B1-3, página 15 del artículo “*Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas*” –sección de Resultados-). Por el contrario, serían esperables peores

respuestas *a priori* en tumores que pertenezcan a subtipos cHER2+ enriquecidos con células mesenquimales que conformen el grueso del tumor y CMTs mesenquimales ($CD44^+CD24^{-/bajo}$) no sensibles a trastuzumab (p. ej. tumores basal/cHER2+ y bajo en claudina/cHER2+).

Nuevos abordajes terapéuticos de los tumores basal/cHER2+. La posible utilización clínica del modelo propuesto de clasificación clínico/molecular mixta para el manejo terapéutico de los tumores cHER2+ debería ser capaz de definir subgrupos de pacientes susceptibles de recibir nuevas estrategias terapéuticas, especialmente en la sub-clase basal/cHER2+ que no se beneficiará de las terapias basadas en trastuzumab.

La capacidad del anti-diabético metformina para suprimir las CMTs con fenotipo mesenquimal resistentes a trastuzumab (Cufi y cols., 2012; Vazquez-Martín y cols., 2011), se encuentra en estos momentos en evaluación en el seno del ensayo clínico METTEN-01, un estudio fase II, randomizado, abierto, multicéntrico de quimioterapia y trastuzumab neoadyuvante con o sin metformina en mujeres diagnosticadas con cáncer de mama primario HER2+ (Martín-Castillo y cols., 2010).

El nuevo conjugado droga-anticuerpo ado-trastuzumab emtansine (T-DM1, Kadcyla), el cual está formado por el potente agente quimioterápico DM1 (maytansinoid) unido a trastuzumab, podría convertirse en un candidato idóneo para suprimir de una manera potente y específica las CMTs mesenquimales refractarias a trastuzumab. Es interesante señalar que estudios muy recientes han puesto de manifiesto que las células tumorales con un fenotipo mesenquimal $CD44^+CD24^{-/bajo}$ presentan una actividad endocítica muy elevada, lo que les podría conferir una mayor sensibilidad a los conjugados droga-anticuerpo tales como el T-DM1. El tratamiento con T-DM1 no sólo es capaz de eliminar las células $CD44^+CD24^{-/bajo}$ pre-existentes cuando se emplea a concentraciones que no son capaces de afectar las células del grueso del tumor, sino también de prevenir la adquisición, mediada por la TEM, de las propiedades de tipo CMT en células tumorales diferenciadas (Diessner y cols., 2014). Este mecanismo de acción del T-DM1 podría explicar su eficacia para prevenir el crecimiento de células de

cáncer de mama basal/HER2+ JIMT-1 refractarias a trastuzumab xenotrasplantadas en modelos animales (Barok y cols., 2011). Dado que las CMTs de tipo mesenquimal $CD44^+CD24^{-/bajo}$ poseen distintivamente una actividad endocítica elevada, la presencia de estas células en los tumores basal/cHER2+ podría abrir la puerta al “caballo de Troya T-DM1”, lo que permitirá una liberación rápida y específica de drogas citotóxicas en las CMTs mesenquimales responsables de la resistencia primaria a trastuzumab (ver Figura 4, página 7 del artículo “*Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas*” – sección de Resultados-).

En relación al posible uso de terapias capaces de disminuir el porcentaje de CMTs $CD44^+CD24^{-/bajo}$ mesenquimales en tumores basales/cHER2+, estudios recientes han descrito la capacidad de algunos antibióticos de suprimir la auto-renovación de las CMTs así como la supervivencia de células mesenquimales diferenciadas a través de la inhibición de la síntesis proteica (Lamb y cols., 2015; Cuyàs y cols., 2015). El grupo de Lisanti demostró que la puromicina, un antibiótico que inhibe de forma competitiva la síntesis proteica, prevenía completamente la formación de mamóferas, y afectaba de forma selectiva los estados celulares de tipo CMT pero no los estados celulares diferenciados (Lamb y cols., 2015). Dado que los subtipos de cáncer de mama de tipo basal y bajo en claudina son los que poseen un mayor número de propiedades de CMTs con una expresión elevada de genes mesenquimales y de la TEM, unido al hecho de que estos subtipos sobre-expresan genes implicados en vías de señalización oncogénicas dirigidas por c-MYC y mTOR -los dos reguladores clave de la maquinaria translacional y síntesis proteica (Chandriani y cols., 2009; Ghosh y cols., 2013)-, todo ellos nos hizo hipotetizar que drogas antimicrobianas podrían ejercer un impacto citotóxico significativo en líneas celulares de cáncer de mama representativas de los subtipos de tipo basal y bajo en claudina, incluyendo el modelo basal/HER2+ JIMT-1 con resistencia primaria a trastuzumab (Cuyàs y cols., 2015). Mediante el empleo de micromatrices de fenotipos (PM del inglés *Phenotype Microarray*), nuestro grupo de laboratorio testó la quimiosensibilidad a casi 100 drogas anti-microbianas y las agrupó en cinco categorías en base al número de dosis que eran capaces de inhibir la tasa de crecimiento en más de un 50% y al número de líneas celulares que respondían a la

droga (ver Figura 2, página 3 del artículo “*Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties*” – sección de Resultados-). Mediante esta aproximación, las drogas que se encontraban en la categoría de actividad citotóxica “muy alta” fueron: La emetina, un antimalárico que interactúa con el sitio E de la subunidad pequeña del ribosoma, impidiendo el desplazamiento del mismo a lo largo del ARNm (Wong y cols., 2014); la dactinomicina o actinomicina D, el primer antibiótico polipeptídico que mostró actividad anticancerosa inhibiendo la síntesis proteica incluyendo la biogénesis del ribosoma; la puromicina, un antibiótico que interactúa con el sitio A del ribosoma, produciendo terminación prematura de la cadena; la daunorrubicina o daunomicina, un quimioterápico de la familia de las antraciclinas que causa stress ribotóxico e inhibe la translación proteica (Sauter y cols., 2011); y la acriflavina, un antimetabolito intercalante que inhibe la síntesis proteica a través de un mecanismo de acción similar al de la emetina. Es importante señalar que, cuando otros autores emplearon el mismo sistema de micromatrices de fenotipos en líneas celulares no basales, tales como la línea celular HER2-enriquecida SKBR3 sensible a trastuzumab (Parmar y cols., (2014), se observaron actividades citotóxicas de otras drogas completamente distintas a los antibióticos descritos en nuestro estudio con un modelo basal/HER2+ resistente a trastuzumab, sugiriendo de nuevo la importancia del subtipo molecular intrínseco pero no del estado de expresión de HER2 en la respuesta al tratamiento. Estos hallazgos, tomados en conjunto, sugieren que los antibióticos que inhiben la síntesis proteica, o nuevas versiones mejoradas de los mismos, podrían utilizarse para eliminar las poblaciones de células mesenquimales (CMTs y del grueso del tumor) insensibles a trastuzumab existentes en carcinomas de mama con un fenotipo basal/HER2+ (ver Figura 3, página 4 del artículo “*Anti-protozoal and anti-bacterial antibiotics that inhibit protein synthesis kill cancer subtypes enriched for stem cell-like properties*” –sección de Resultados-).

Uno de los grandes inconvenientes de sub-clasificar en múltiples categorías los tumores de mama es la posible descripción de entidades “huérfanas” con números de pacientes muy reducidos y, por tanto, insuficientes para el diseño adecuado de ensayos clínicos con nuevas terapias. Sin embargo, la sub-clasificación del cáncer de

mama cHER2+ en dos grandes subtipos “basal/cHER2+” y “no-basal/cHER2+” mediante el empleo de técnicas IHC de uso habitual en la clínica, podría aportar una información pronóstica y predictiva de mejor calidad para el diseño de nuevas estrategias translacionales. La reclasificación de los tumores cHER2+ basada en marcadores basales y/o relacionados con las CMTs podría impactar de forma importante en el tratamiento de las pacientes con tumores de mama cHER2+. Por ejemplo, T-DM1 ha sido aprobado para el tratamiento del cáncer de mama localmente avanzado o metastásico HER2+ refractario. Por tanto, la incorporación a nuevas fases de investigación clínica de T-DM1 u otros agentes capaces de eliminar de manera potente y específica las CMTs mesenquimales (Brooks y cols., 2015) podría mejorar el manejo clínico de las pacientes con cáncer de mama basal/cHER2+ que, de acuerdo a los estudios reflejados en esta tesis, no parecen beneficiarse de terapias basadas en trastuzumab.

CONCLUSIONES FINALES

CONCLUSIONES FINALES

Las conclusiones finales del estudio son:

- 1.) El cáncer de mama cHER2+ no puede ser considerado como una única enfermedad en términos de pronóstico y de respuesta al tratamiento con trastuzumab.
- 2.) La identificación por inmunohistoquímica de las CKs basales 5/6 podría suponer un método sencillo, rápido y eficaz para reclasificar a las mujeres diagnosticadas con cáncer de mama cHER2+, lo que mejoraría el pronóstico y el plan terapéutico de aquellas pacientes con tumores agresivos de fenotipo basal/cHER2+.
- 3.) La reclasificación de los tumores de mama cHER2+ en base a la presencia de marcadores basales (p.ej. CK 5/6) y/o de marcadores relacionados con las CMTs (p. ej. ALDH y CD44⁺CD24^{-/bajo}) podría informarnos *a priori* de su sensibilidad a trastuzumab, lo que mejoraría el valor predictivo de HER2+.
- 4.) Un posible abordaje terapéutico para los cánceres de mama basal/cHER2+, que parecen no beneficiarse de las terapias basadas en trastuzumab, podría implicar el uso de conjugados droga-anti-HER2 como T-DM1 y antibióticos que inhiben la síntesis proteica.

BIBLIOGRAFÍA

Ablett MP, Singh JK, Clarke RB. Stem cells in breast tumours: are they ready for the clinic? *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2104-2116.

Al Sayed AD, El Weshi AN, Tulbah AM, Rahal MM, Ezzat AA. Metaplastic carcinoma of the breast clinical presentation, treatment results and prognostic factors. *Acta Oncol*. 2006;45(2):188-95.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-3988.

Alexe G, Dalgin GS, Scandfeld D, Tamayo P, Mesirov JP, DeLisi C, Harris L, Barnard N, Martel M, Levine AJ, Ganesan S, Bhanot G. High expression of lymphocyte-associated genes in node-negative HER2+ breast cancers correlates with lower recurrence rates. *Cancer Res*. 2007;67(22):10669-10676.

Allen M, Louise Jones J. Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol*. 2011;223(2):162-176.

André F, Campone M, Hurvitz SA, Vittori L, Pylvaenäinen I, Sahmoud T, O'regan RM (2008, Abstract # 1003) Multicenter phase I clinical trial of daily and weekly RAD001 in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab in patients with HER2-overexpressing metastatic breast cancer with prior resistance to trastuzumab. American Society of Clinical Oncology 2008 Annual Meeting.

Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol*. 2012;13(1):43-48.

Bagaria SP, Ray PS, Wang J, Kropcho L, Chung A, Sim MS, Shamonki JM, Martino S, Cui X, Giuliano AE. Prognostic value of basal phenotype in HER2-overexpressing breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(3):935-940.

Bai WD, Ye XM, Zhang MY, Zhu HY, Xi WJ, Huang X, Zhao J, Gu B, Zheng GX, Yang AG, Jia LT. MiR-200c suppresses TGF- β signaling and counteracts trastuzumab resistance and metastasis by targeting ZNF217 and ZEB1 in breast cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(6):1356-1368.

Barnes DM. c-erbB-2 amplification in mammary carcinoma. *J Cell Biochem Suppl*. 1993;17G:132-138.

Barok M, Tanner M, Könink K, Isola J. Trastuzumab-DM1 causes tumour growth inhibition by mitotic catastrophe in trastuzumab-resistant breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res*. 2011;13:R46.

Baselga J, Cortés J, Kim SB, Im SA, Hegg R, Im YH, Roman L, Pedrini JL, Pienkowski T, Knott A, Clark E, Benyunes MC, Ross G, Swain SM; CLEOPATRA Study Group. Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(2):109-119.

Baselga J, Perez EA, Pienkowski T, Bell R. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*. 2006;11(1):4-12.

Bedard PL, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2009;14(1):55-66.

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet*. 2008;40(5):499-507.

Bender LM, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer. *Front Biosci*. 2008;13:3906-3912.

Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007;12(4):395-402.

Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med*. 2000;21(6):167-223.

Bertucci F, Borie N, Ginestier C, Groulet A, Charafe-Jauffret E, Adélaïde J, Geneix J, Bachelart L, Finetti P, Koki A, Hermitte F, Hassoun J, Debono S, Viens P, Fert V, Jacquemier J, Birnbaum D. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers. *Oncogene*. 2004;23(14):2564-2575.

Bhagirath D, Zhao X, West WW, Qiu F, Band H, Band V. Cell type of origin as well as genetic alterations contribute to breast cancer phenotypes. *Oncotarget*. 2015;6(11):9018-9030.

Bhargava R, Beriwal S, Striebel JM, Dabbs DJ. Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expression of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(2):113-118.

Brewster A, Bondy M. Clinical and molecular epidemiology of breast cancer. In: *Molecular Oncology of breast cancer*. 2005;34-47. Eds. Ross JS and Hortobagyi GN, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.

Brooks MD, Burness ML, Wicha MS. Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell*. 2015;17(3):260-271.

Calabrich A, Fernandes Gdos S, Katz A. Trastuzumab: mechanisms of resistance and therapeutic opportunities. *Oncology (Williston Park)*. 2008;22(11):1250-1258.

Camerlingo R, Ferraro GA, De Francesco F, Romano M, Nicoletti G, Di Bonito M, Rinaldo M, D'Andrea F, Pirozzi G. The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer. *Oncol Rep*. 2014;31(3):1127-

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; 490(7418):61-70.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, Karaca G, Troester MA, Tse CK, Edmiston S, Deming SL, Geradts J, Cheang MC, Nielsen TO, Moorman PG, Earp HS, Millikan RC. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *J Am Med Assoc* 2006;295(21):2492-2502.

Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(10):4285-4289.

Chaffer CL, Brueckmann I, Scheel C, Kaestli AJ, Wiggins PA, Rodrigues LO, Brooks M, Reinhardt F, Su Y, Polyak K, Arendt LM, Kuperwasser C, Bieri B, Weinberg RA. Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):7950-7955.

Chandler JM, Lagasse E. Cancerous stem cells: deviant stem cells with cancer-causing misbehavior. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(2):13.

Chandriani S, Frengen E, Cowling VH, Pendergrass SA, Perou CM, Whitfield ML, Cole MD. A core MYC gene expression signature is prominent in basal-like breast cancer but only partially overlaps the core serum response. *PLoS One* 2009; 4(8):e6693.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Wicinski J, Cervera N, Finetti P, Hur MH, Diebel ME, Monville F, Dutcher J, Brown M, Viens P, Xerri L, Bertucci F, Stassi G, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res*. 2009a;69(4):1302-1313.

Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer*. 2009b;9:202.

Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008;75(2):75-84.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 2009;101(10):736-750.

Chekhun SV, Zadvorny TV, Tymovska YO, Anikusko MF, Novak OE, Polishchuk LZ. CD44+/CD24- markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Exp Oncol*. 2015;37(1):58-63.

Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 2008;6(10):1521-1533.

Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, Huntsman D, Olivetto IA, Nielsen TO, Gelmon K. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008;26(35):5697-5704.

Chung A, Choi M, Han BC, Bose S, Zhang X, Medina-Kauwe L, Sims J, Murali R, Taguam M, Varda M, Schiff R, Giuliano A, Cui X. Basal Protein Expression Is Associated With Worse Outcome and Trastuzumab Resistance in HER2+ Invasive Breast Cancer. *Clin Breast Cancer.* 2015 Jun 19. pii: S1526-8209(15)00117-2.

Chung M, Chang HR, Bland KI, Wanebo HJ. Younger women with breast carcinoma have a poorer prognosis than older women. *Cancer.* 1996;77(1):97-103.

Chung YC, Kuo JF, Wei WC, Chang KJ, Chao WT. Caveolin-1 Dependent Endocytosis Enhances the Chemosensitivity of HER-2 Positive Breast Cancer Cells to Trastuzumab Emtansine (T-DM1). *PLoS One.* 2015;10(7):e0133072.

Cnattingius S, Torr  ng A, Ekbom A, Granath F, Petersson G, Lambe M. Pregnancy characteristics and maternal risk of breast cancer. *JAMA* 2005;294(19):2474-2480.

Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, Baili P, Rachet B, Gatta G, Hakulinen T, Micheli A, Sant M, Weir HK, Elwood JM, Tsukuma H, Koifman S, E Silva GA, Francisci S, Santaquilani M, Verdecchia A, Storm HH, Young JL; CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008;9(8):730-756.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet.* 1997;350(9084):1047-1059.

Collins V, Loeffler R, Tivey H. Observations on growth rates of human tumors. *Am J Roentgenol* 1956;76(5):988-998.

Cufi S, Corominas-Faja B, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Dorca J, Bosch-Barrera J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human breast cancer xenografts. *Oncotarget.* 2012;3:395-398.

Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martin-Castillo B, Menendez JA. Autophagy-related gene 12 (ATG12) is a novel

determinant of primary resistance to HER2-targeted therapies: utility of transcriptome analysis of the autophagy interactome to guide breast cancer treatment. *Oncotarget*. 2012a;3(12):1600-1614.

Cuyàs E, Martin-Castillo B, Corominas-Faja B, Massaguer A, Bosch-Barrera J, Menendez JA. Anti-protozoal and anti-bacterial Antibiotics that inhibit protein synthesis kill Cancer subtypes enriched for stem cell-like properties. *Cell Cycle*. 2015 May 13:0. [Epub ahead of print]

Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005; 366(9499):1784-1793.

De Mattos-Arruda L, Bottai G, Nuciforo PG, Di Tommaso L, Giovannetti E, Peg V, Losurdo A, Pérez-García J, Masci G, Corsi F, Cortés J, Seoane J, Calin GA, Santarpia L. MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients. *Oncotarget*. 2015 Oct 7. [Epub ahead of print]

Deng G, Lu Y, Zlotnikov G, Thor AD, Smith HS. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*. 1996;274(5295):2057-2059.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2006;25(1):9-34.

Deugnier M, Teulière J, Faraldo MM, Thiery JP, y Glukhova MA. The importance of being a myoepithelial cell. *Breast Cancer Res*. 2002;4(6):224-230.

Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science*. 1987;237(4811):178-182.

Dickson RB. Biochemical control of breast Development. 1996. En *Disease of the breast*. 1996;15-25. Eds. Harris JS, Lippmann ME, Morrow M, y Hellman S, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

Diessner J, Bruttel V, Stein RG, Horn E, Häusler SF, Dietl J, Hönig A, Wischhusen J. Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1). *Cell Death Dis*. 2014;5:e1149.

Dixon JM, Page DL, Anderson TJ, Lee D, Elton RA, Stewart HJ, Forrest AP. Long-term survivors after breast cancer. *Br J Surg*. 1985;72(6):445-448.

Dokmanovic M, Hirsch DS, Shen Y, Wu WJ. Rac1 contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells: Rac1 as a potential therapeutic target for the treatment of trastuzumab-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther*. 2009;8(6):1557-1569.

Dontu G, Liu S, Wicha MS. Stem cells in mammary development and carcinogenesis: implications for prevention and treatment. *Stem Cell Rev.* 2005;1(3):207-213.

Dougall WC, Qian X, Peterson NC, Miller MJ, Samanta A, Greene MI. The neu-oncogene: signal transduction pathways, transformation mechanisms and evolving therapies. *Oncogene.* 1994;9(8):2109-2123.

Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(1):17-25.

Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, Pickell K, Aguilar J, Lazetic S, Smith-Berdan S, Clarke MF, Hoey T, Lewicki J, Gurney AL. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One.* 2008;3(6):e2428.

Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R, Martín MA. Células madre tumorales: una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Rev Senol Patol Mamar.* 2012;25(3):107-115.

Eisen MB, Brown PO. DNA arrays for analysis of gene expression. *Methods Enzymol.* 1999;303:179-205.

Elston CW, Ellis IO. Normal structure and Development abnormalities. The breast; systemic Pathology 1998;1-19. Elston CW & Ellis IO, Churchill Livingstone, Edinburgh, UK.

Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, Metzeler KH, Poepl A, Ling V, Beyene J, Canty AJ, Danska JS, Bohlander SK, Buske C, Minden MD, Golub TR, Jurisica I, Ebert BL, Dick JE. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med.* 2011;17(9):1086-1093.

Esteller M, Silva M, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB, Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92(7):564-569.

Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358(11):1148-1159.

Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2839-2845.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from <http://globocan.iarc.fr>.

Fialkow PJ, Gartler SM, Yoshida A. Clonal origin of chronic myelocytic leukemia in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967;58(4):1468-1471.

Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10:R25.

Ford D, Easton DF, Peto J: Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Hum Genet.* 1995; 57(6):1457-1462.

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struwing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):676-689.

Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, Trudel M, Akslen LA. Germ line BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(19):1482-1485.

Franke WW, Schiller DL, Hatzfeld M, Winter S. Protein complexes of intermediate-sized filaments: melting of cytokeratin complexes in urea reveals different polypeptide separation characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 1983;80(23):7113-7117.

Franklin MC, Carey KD, Vajdos FF, Leahy DJ, de Vos AM, Sliwkowski MX. Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex. *Cancer Cell.* 2004;5(4):317-328.

Garrett JT, Sutton CR, Kurupi R, Bialucha CU, Ettenberg SA, Collins SD, Sheng Q, Wallweber J, Defazio-Eli L, Arteaga CL. Combination of antibody that inhibits ligand-independent HER3 dimerization and a p110 α inhibitor potently blocks PI3K signaling and growth of HER2+ breast cancers. *Cancer Res.* 2013;73(19):6013-6023.

Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005;280(10):8875-8883.

Ghosh S, Varela L, Sood A, Park BH, Lotan TL. mTOR signaling feedback modulates mammary epithelial differentiation and restrains invasion downstream of PTEN loss. *Cancer Res* 2013; 73(16):5218-5231.

Gianni L, Bianchini G, Kiermaier A, et al. Neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab: biomarker analyses of a 4-arm randomized phase II Study (NeoSphere) in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2011;71(24):abstract S5-1.

Gilewski T, Norton L. Cytokinetics and breast cancer chemotherapy. En: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. *Diseases of the breast.* 2a Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.1996;751-768.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1(5):555-567.

Gonzalez-Angulo AM, Hortobágyi GN, Esteva FJ. Adjuvant therapy with trastuzumab for HER-2/neu-positive breast cancer. *Oncologist*. 2006;11(8):857-867.

Guarneri V, Dieci MV, Barbieri E, Piacentini F, Omarini C, Ficarra G, Bettelli S, Conte PF. Loss of HER2 positivity and prognosis after neoadjuvant therapy in HER2-positive breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2013;24(12):2990-4.

Gunter MJ, Hoover DR, Yu H, Wassertheil-Smoller S, Rohan TE, Manson JE, Li J, Ho GY, Xue X, Anderson GL, Kaplan RC, Harris TG, Howard BV, Wylie-Rosett J, Burk RD, Strickler HD. Insulin, insulin-like growth factor-I, and risk of breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(1):48-60.

Guo W, Keckesova Z, Donaher JL, Shibue T, Tischler V, Reinhardt F, Itzkovitz S, Noske A, Zürcher-Härdi U, Bell G, Tam WL, Mani SA, van Oudenaarden A, Weinberg RA. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell*. 2012;148(5):1015-1028.

Gupta PB, Fillmore CM, Jiang G, Shapira SD, Tao K, Kuperwasser C, Lander ES. Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell*. 2011;146(4):633-644.

Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;127(4):679-95.

Haagensen C. Enfermedades de la mama. 1a Ed. Buenos Aires: Editorial Beta; 1973.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990; 250(4988):1684-1689.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007a;25(33):5287-5312.

Harris LN, You F, Schnitt SJ, Witkiewicz A, Lu X, Sgroi D, Ryan PD, Come SE, Burstein HJ, Lesnikowski BA, Kamma M, Friedman PN, Gelman R, Iglehart JD, Winer EP. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive

early breast cancer. Clin Cancer Res. 2007b;13(4):1198-1207.

Haviv I, Polyak K, Qiu W, Hu M, Campbell I. Origin of carcinoma associated fibroblasts. Cell Cycle. 2009;8(4):589-595.

Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. Cancer Res. 2009;69(10):4116-4124.

Hennessy, BT, Krishnamurthy, S, Giordano, S, Buchholz, TA, Kau, SW, Duan, Z, Valero, V, Hortobagyi, GN. Squamous cell carcinoma of the breast. J. Clin. Oncol. 2005;23(31):7827-7835.

Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. Exp Cell Res, 2003; 284(1):99-110.

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. Breast Cancer Res. 2008;10:R53.

Huang X, Gao L, Wang S, McManaman JL, Thor AD, Yang X, Esteva FJ, Liu B. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2, erbB3, and insulin-like growth factor-I receptor in breast cancer cells resistant to herceptin. Cancer Res. 2010;70(3):1204-1214.

Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. N Engl J Med. 2007;357(1):39-51.

Hugh, J, Hanson, J, Cheang, MCU, Nielsen, TO, Perou, CM, Dumontet, C, Reed, J, Krajewska, M, Treilleux, I, Rupin, M, Magherini, E, Mackey, J, Martin, M, Vogel, C. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. J. Clin. Oncol. 2009;27(8):1168-1176.

Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression. J Cell Physiol 2007; 213(2):374-383.

Hurley J, Doliny P, Reis I, Silva O, Gomez-Fernandez C, Velez P, Pauletti G, Powell JE, Pegram MD, Slamon DJ. Docetaxel, cisplatin, and trastuzumab as primary systemic therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive locally advanced breast cancer. J Clin Oncol. 2006;24(12):1831-1838.

IARC (2008). World cancer report 2008. Lyon, International Agency for Research on Cancer.

Idowu MO, Kmiecziak M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, Manjili MH. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol*. 2012;43(3):364-73.

Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1397-1402.

Imigo F, Mansilla E, Delama I, Poblete MT, Fonfach. Clasificación molecular del cáncer de mama. *C. Cuad. Cir*. 2011;25:67-74.

Ithimakin S, Day KC, Malik F, Zen Q, Dawsey SJ, Bersano-Begey TF, Quraishi AA, Ignatoski KW, Daignault S, Davis A, Hall CL, Palanisamy N, Heath AN, Tawakkol N, Luther TK, Clouthier SG, Chadwick WA, Day ML, Kleer CG, Thomas DG, Hayes DF, Korkaya H, Wicha MS. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. *Cancer Res*. 2013;73(5):1635-1646.

Johnston SR, Leary A. Lapatinib: a novel EGFR/HER2 tyrosine kinase inhibitor for cancer. *Drugs of Today*. 2006;42(7):441-453.

Jolicoeur F. Intrauterine breast Development and the mammary myoepithelial lineage. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005;10(3):199-210.

Joshi K, Smith JA, Perusinghe N, y Monaghan P. Cell proliferation in the human mammary epithelium. Differential contribution by epithelial and myoepithelial cells. *Am J Pathol*. 1986; 124(2):199-206.

Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*. 2013;501(7467):346-54.

Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(17):2813-2820.

Kim S, Wong P, Coulombe PA. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. *Nature*. 2006;441(7091):362-365.

Klapper LN, Glathe S, Vaisman N, Hynes NE, Andrews GC, Sela M, Yarden Y. The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; 96(9):4995-5000.

Knoepfler PS. Why Myc? An Unexpected Ingredient in the Stem Cell Cocktail. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(1):18-21.

Korkaya H, Paulson A, Iovino F, Wicha MS. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene*.

2008;27(47):6120-6130.

Korkaya H, Wicha MS. HER-2, notch, and breast cancer stem cells: targeting an axis of evil. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):1845-1847.

Korkaya H, Wicha MS. HER2 and breast cancer stem cells: more than meets the eye. *Cancer Res.* 2013;73(12):3489-3493.

Krop IE, Burstein HJ. Trastuzumab: qui bono? *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(23):1772-1775.

Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol.* 2005;18(10):1321-1328.

Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmström P, Wilking N, Bergh J, Isola J. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(14):4185-4191.

Lacey JV, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF, Hoover RN, Prorok PC, Berg CD, Hartge P; Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Project Team. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 2009;9:84.

Lamb R, Harrison H, Smith DL, Townsend PA, Jackson T, Ozsvári B, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Howell A, Lisanti MP, Sotgia F. Targeting tumor-initiating cells: eliminating anabolic cancer stem cells with inhibitors of protein synthesis or by mimicking caloric restriction. *Oncotarget.* 2015;6(7):4585-4601.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367(6464):645-648.

Lee CH, Coulombe PA. Self-organization of keratin intermediate filaments into cross-linked networks. *The Journal of Cell Biology.* 2009;186(3):409-421.

Lesniak D, Sabri S, Xu Y, Graham K, Bhatnagar P, Suresh M, Abdulkarim B. Spontaneous epithelial-mesenchymal transition and resistance to HER-2-targeted therapies in HER-2-positive luminal breast cancer. *PLoS One.* 2013;8(8):e71987.

Lesniak D, Xu Y, Deschenes J, Lai R, Thoms J, Murray D, Gosh S, Mackey JR, Sabri S, Abdulkarim B. Beta1-integrin circumvents the antiproliferative effects of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2009;69(22):8620-8628.

Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, Blattler WA, Lambert JM, Chari RV, Lutz RJ, Wong WL, Jacobson FS, Koeppen H, Schwall RH,

Kenkare-Mitra SR, Spencer SD, Sliwkowski MX. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* 2008;68(22):9280-9290.

Lewis T, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998;74:49-139.

Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, Wong H, Rosen J, Chang JC. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(9):672-679.

Liu H, Fan Q, Zhang Z, Li X, Yu H, Meng F. Basal-HER2 phenotype shows poorer survival than basal-like phenotype in hormone receptor-negative invasive breast cancers. *Hum Pathol.* 2008; 39(2):167-174.

Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, Wicha MS. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. *Stem Cell Reports.* 2013;2(1):78-91.

Liu S, Wicha MS. Targeting breast cancer stem cells. *J Clin Oncol.* 2010;28(25):4006-12.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99.

Lower EE, Glass E, Blau R, Harman S. HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;113(2):301-306.

Lu Y, Zi X, Zhao Y, Mascarenhas D, Pollak M. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(24):1852-1857.

Luo J, Yin X, Ma T, Lu J. Stem cells in normal mammary gland and breast cancer. *Am J Med Sci.* 2010;339(4):366-370.

Maggard MA, O'Connell JB, Lane KE, Liu JH, Etzioni DA, KO CY. Do young breast cancer patients have worse outcomes? *J Surg Res.* 2003;113(1):109-113.

Magnifico A, Albano L, Campaner S, Delia D, Castiglioni F, Gasparini P, Sozzi G, Fontanella E, Menard S, Tagliabue E. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. *Clin Cancer Res.* 2009;15(6):2010-2021.

Magnusson C, Baron JA, Correia N, Bergström R, Adami HO, Persson I. Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-pro- gesterone-replacement therapy. *Int J Cancer.* 1999; 81(3):339-344.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008;133(4):704-715.

Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(26):2025-2032.

Martin-Castillo B, Dorca J, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Lopez-Bonet E, Garcia M, Del Barco S, Menendez JA. Incorporating the antidiabetic drug metformin in HER2-positive breast cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy and trastuzumab: an ongoing clinical-translational research experience at the Catalan Institute of Oncology. *Ann Oncol*. 2010;21(1):187-189.

Martin-Castillo B, Lopez-Bonet E, Buxó M, Dorca J, Tuca-Rodríguez F, Ruano MA, Colomer R, Menendez JA. Cytokeratin 5/6 fingerprinting in HER2-positive tumors identifies a poor prognosis and trastuzumab-resistant basal-HER2 subtype of breast cancer. *Oncotarget*. 2015a;6(9):7104-7122.

Martin-Castillo B, Lopez-Bonet E, Cuyàs E, Viñas G, Pernas S, Dorca J, Menendez JA. Cancer stem cell-driven efficacy of trastuzumab (Herceptin): Towards a reclassification of clinically HER2-positive breast carcinomas. *Oncotarget*. 2015b. [Epub ahead of print]

Martin-Castillo B, Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Moreno JM, Corominas-Faja B, Urruticoechea A, Martín ÁG, López-Bonet E, Menendez JA. Basal/HER2 breast carcinomas: integrating molecular taxonomy with cancer stem cell dynamics to predict primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2013;12(2):225-245.

McCafferty M, Healy N, Kerin M. Breast cancer subtypes and molecular biomarkers. *Diagnostic Histopathology* 2009;15(10):485-489.

Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res*. 2009;11(6):R82.

Michael B, Sporn MD, George J, Todaro MD. Autocrine Secretion and Malignant Transformation of Cells. *N Engl J Med* 1980; 303(15):878-880.

Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, Nyante S, Livasy C, Carey L, Earp HS, Perou CM. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(1):123-139.

Mittendorf EA, Wu Y, Scaltriti M, Meric-Bernstam F, Hunt KK, Dawood S, Esteva FJ, Buzdar AU, Chen H, Eksambi S, Hortobagyi GN, Baselga J, Gonzalez-Angulo AM. Loss

of HER2 amplification following trastuzumab-based neoadjuvant systemic therapy and survival outcomes. *Clin Cancer Res.* 2009;15(23):7381-7388.

Modi S, Stopeck AT, Linden HM, Solit DB, Chandarlapaty S, Rosen N, D'Andrea G, Dickler MN, Moynahan ME, Sugarman S, Ma W, Patil S, Norton L, Hannah AL, Hudis C. Hsp90 inhibition is effective in breast cancer: A phase 2 trial of tanespimycin (17AAG) plus trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer progressing on trastuzumab. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):5132–5139.

Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61(12):4744-4749.

Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31(1):11-24.

Moreno-Aspitia A, Hillman DW, Dyar SH, Tenner KS, Gralow J, Kaufman PA, Davidson NE, Lafky JM, Reinholz MM, Lingle WL, Kutteh LA, Carney WP, Dueck AC, Perez EA. Soluble human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) levels in patients with HER2-positive breast cancer receiving chemotherapy with or without trastuzumab: results from North Central Cancer Treatment Group adjuvant trial N9831. *Cancer.* 2013;119(15):2675-2682.

Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell.* 2004;6(2):117-127.

Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, Jovin TM. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 2005;65(2):473-482.

Nahta R, Esteva FJ. HER2 therapy: Molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res.* 2006;8(6):215.

Nahta R, O'Regan RM. Evolving strategies for overcoming resistance to HER2-directed therapy: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Clin Breast Cancer.* 2010;10:S72-8.

Nahta R, Takahashi T, Ueno NT, Hung MC, Esteva FJ. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64(11):3981-3986.

Nahta R, Yuan LX, Zhang B, Kobayashi R, Esteva FJ. Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 2005;65(23):11118-11128.

Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 2006;10(6):515-527.

Newcomb PA, Storer BE, Longnecker MP, Mittendorf R, Greenberg ER, Clapp RW, Burke KP, Willett WC, MacMahon B. Lactation and a reduced risk of premenopausal breast cancer. *N Engl J Med*. 1994;330(2):81-87.

Newman B, Mu H, Butler LM, Millikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. *JAMA*. 1998;279(12):915-921.

Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):274-84.

Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):341-52.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-5374.

Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, Davies SR, Snider J, Stijleman IJ, Reed J, Cheang MC, Mardis ER, Perou CM, Bernard PS, Ellis MJ. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor positive breast cancer. *Clin. Cancer Res*. 2010;16(21):5222-5232.

Nuciforo PG, Aura C, Holmes E, Prudkin L, Jimenez J, Martinez P, Ameels H, de la Peña L, Ellis C, Eidtmann H, Piccart-Gebhart MJ, Scaltriti M, Baselga J. Benefit to neoadjuvant anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in HER2-positive primary breast cancer is independent of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) status. *Ann Oncol*. 2015;26(7):1494-1500.

Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J*. 2000;19(13):3159-3167.

Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cufí S, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Iglesias JM, López-Bonet E, Martín ÁG, Menéndez JA. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle*. 2012;11(21):4020-4032.

Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Cufí S, Torres-Garcia VZ, Sauri-Nadal T, Barco SD, Lopez-Bonet E, Brunet J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Inhibitor of Apoptosis (IAP) survivin is indispensable for survival of HER2 gene-amplified breast cancer cells with primary resistance to HER1/2-targeted therapies. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(2):412-419.

Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Cufí S, Del Barco S, Lopez-Bonet E, Brunet J, Menendez JA. Dynamic emergence of the mesenchymal CD44(pos)CD24(neg/low) phenotype in HER2-gene amplified breast cancer cells with de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(1):27-33.

Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Pérez-Martinez MC, Cufí S, Del Barco S, et al. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). *Int J Oncol* 2010;37(3):669-678.

Osborne MP. Breast Development and anatomy. 1996. En *Diseases of the breast*, pp 1-14. Eds Herrmann and Harris, Plenum Press, New York.

Osipo C, Patel P, Rizzo P, Clementz AG, Hao L, Golde TE, Miele L. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. *Oncogene*. 2008;27(37):5019-5032.

Owens TW, Naylor MJ. Breast cancer stem cells. *Front. Physiol*. 2013;4:225.

Paik S, Kim C, Wolmark N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(13):1409-1411.

Painter JT, Clayton NP, y Herbert RA. Useful immunohistochemical markers of tumor differentiation. *Toxicol Pathol*. 2010; 38(1):131-141.

Pályi-Krékk Z, Barok M, Isola J, Tammi M, Szöllosi J, Nagy P. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. *Eur J Cancer*. 2007;43(16):2423-2433.

Papewalis J, Nikitin AY, Rajewsky MF. G to A polymorphism at amino acid codon 655 of the human erbB-2/HER2 gene. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5452.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1160-1167.

Parmar H, Cunha GR. Epithelial stromal interactions in the mouse and human mammary gland in vivo. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(3):437-458.

Parmar N, Wetton N, Alvarado S, Kennedy S. Profiling of human normal and cancer cell lines using phenotype microarray analysis. *FASEB J* 2014; 28:613-615.

Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene*. 1996;13(1):63-72.

Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, Chen B, Geiger XJ, Jenkins RB, Lingle WL, Davidson NE, Martino S, Kaufman PA, Kutteh LA, Sledge GW, Harris LN, Gralow JR, Reinholz MM. Impact of PTEN protein expression on benefit from adjuvant trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(17):2115-2122.

Perez EA, Reinholz MM, Hillman DW, Tenner KS, Schroeder MJ, Davidson NE, Martino S, Sledge GW, Harris LN, Gralow JR, Dueck AC, Ketterling RP, Ingle JN, Lingle WL, Kaufman PA, Visscher DW, Jenkins RB. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(28):4307-4315.

Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Sledge G, Geyer CE Jr, Martino S, Rastogi P, Gralow J, Swain SM, Winer EP, Colon-Otero G, Davidson NE, Mamounas E, Zujewski JA, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer: planned joint analysis of overall survival from NSABP B-31 and NCCTG N9831. *J Clin Oncol*. 2014;32(33):3744-3752.

Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96(16):9212-9217.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406(6797):747-752.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, Gianni L, Baselga J, Bell R, Jackisch C, Cameron D, Dowsett M, Barrios CH, Steger G, Huang C-S, Andersson M, Inbar M, Lichinitser M, Lang I, Nitz U, Iwata H, Thomssen C, Lohrisch C, Suter TM, Ruschoff J, Suto T, Greaux V, Ward C, Straehle C, Mcfadden E, Dolci MS, Gelber RD. The Herceptin Adjuvant Trial Study T. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New Engl J Med* 2005;353(16):1659-1672.

Pierce GB. Neoplasms, differentiations and mutations. *Am J Pathol*. 1974;77(1):103-118.

Pogue-Geile KL, Kim C, Jeong JH, Tanaka N, Bandos H, Gavin PG, Fumagalli D, Goldstein LC, Sneige N, Burandt E, Taniyama Y, Bohn OL, Lee A, Kim SI, Reilly ML, Remillard MY, Blackmon NL, Kim SR, Horne ZD, Rastogi P, Fehrenbacher L, Romond EH, Swain SM, Mamounas EP, Wickerham DL, Geyer CE Jr, Costantino JP, Wolmark N, Paik S. Predicting degree of benefit from adjuvant trastuzumab in NSABP trial B-31. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(23):1782-1788.

Pogue-Geile KL, Song N, Jeong JH, Gavin PG, Kim SR, Blackmon NL, Finnigan M, Rastogi P, Fehrenbacher L, Mamounas EP, Swain SM, Wickerham DL, Geyer CE Jr, Costantino JP, Wolmark N, Paik S. Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial. *J Clin Oncol.* 2015;33(12):1340-1347.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):265–273.

Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506-5511.

Prat A, Carey LA, Adamo B, Vidal M, Tabernero J, Cortés J, Parker JS, Perou CM, Baselga J. Molecular features and survival outcomes of the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(8). pii: dju152.

Prat A, Karginova O, Parker JS, Fan C, He X, Bixby L, Harrell JC, Roman E, Adamo B, Troester M, Perou CM. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;142(2):237-255.

Prat A, Parker J, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz J, He X, Perou C. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5): R68.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2011;5(1):5-23.

Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med.* 2006;354(9):2463-2472.

Rabindran SK, Discafani CM, Rosfjord EC, Baxter M, Floyd MB, Golas J, Hallett WA, Johnson BD, Nilakantan R, Overbeek E, Reich MF, Shen R, Shi X, Tsou HR, Wang YF, Wissner A. Antitumor activity of HKI-272, an orally active, irreversible inhibitor of the HER-2 tyrosine kinase. *Cancer Res.* 2004;64(11):3958-3965.

Rexer BN, Chanthaphaychith S, Dahlman K, Arteaga CL. Direct inhibition of PI3K in combination with dual HER2 inhibitors is required for optimal antitumor activity in HER2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2014;16(1):R9.

Reya T, Morrison S J, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-111.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011;64(11):937-946.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673-1684.

Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Puztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics*. 2004a;3(4):379-398.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/*neu* oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Oncologist*. 1998;3(4):237-252.

Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, Stagliano NE, Ginsburg GS, Symmans WF, Puztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapies for cancer 2004. *Am J Clin Pathol*. 2004b;122(4):598-609.

Ross RK, Paganini-Hill A, Wan PC, Pike MC. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(4):328-332.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P, Morandi P, Fan C, Rabiul I, Ross JS, Hortobagyi GN, Puztai L. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5678-5685.

Russo J, Russo IH. Development of the human breast. *Maturitas*. 2004;49(1):2-15.

Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int*. 2007;7:9.

Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1995;19(3):183-232.

Santinelli A, Pisa E, Stramazzotti D, Fabris G. HER-2 status discrepancy between primary breast cancer and metastatic sites. Impact on target therapy. *Int J Cancer*. 2008;122(5):999-1004.

Sarrió D, Franklin CK, Mackay A, Reis-Filho JS, Isacke CM. Epithelial and mesenchymal subpopulations within normal basal breast cell lines exhibit distinct stem cell/progenitor properties. *Stem Cells*. 2012;30(2):292-303.

Sarrió D, Rodríguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008;68(4):989-997.

Sauter KA, Wood LJ, Wong J, Iordanov M, Magun BE. Doxorubicin and Daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biol Ther* 2011;11(12):1008-1016.

Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J, Baselga J. Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(8):628-638.

Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, Weinberg RA. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-516.

Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* 2004;306(5701):1506-1507.

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol*. 2010;23(2):60-64.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*. 2006;439(7072):84-88.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007;11(3):259–273.

Sjöström M, Hartman L, Honeth G, Grabau D, Malmström P, Hegardt C, Fernö M, Niméus E. Stem cell biomarker ALDH1A1 in breast cancer shows an association with prognosis and clinicopathological variables that is highly cut-off dependent. *J Clin Pathol*. 2015 Jul 14. pii: jclinpath-2015-203092.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-182.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a

monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-792.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, Foekens JA, Martens JW. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008;68(9):3108-3114.

Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science*. 1991;254(5035):1153-1160.

Soon PS, Kim E, Pon CK, Gill AJ, Moore K, Spillane AJ, Benn DE, Baxter RC. Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(1):1-12.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclass with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(19):10869-10874.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumors subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8418-8423.

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(18):10393-10398.

Sotiriou C, Pusztai L. Gene-Expression Signatures in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(8):790-800.

Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(34):5838-5847.

Staaf J, Ringnér M, Vallon-Christersson J, Jönsson G, Bendahl PO, Holm K, Arason A, Gunnarsson H, Hegardt C, Agnarsson BA, Luts L, Grabau D, Fernö M, Malmström PO, Johannsson OT, Loman N, Barkardottir RB, Borg A. Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1813-1820.

Steinberg KK, Thacker SB, Smith SJ, Stroup DF, Zack MM, Flanders WD, Berkelman RL. A meta-analysis of the effect of estrogen replacement therapy on the risk of breast cancer. *JAMA*. 1991; 265(15):1985-1990.

Stewart M. Intermediate filaments: structure, assembly and molecular interactions. *Curr Opin Cell Biol.* 1990;2(1):91-100.

Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(10):791-799.

Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat.* 2001;67(2):93-109.

Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HI, Eaves CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature.* 2006;439(7079):993-997.

Storci G, Sansone P, Trere D, Tavolari S, Taffurelli M, Ceccarelli C, Guarnieri T, Paterini P, Pariali M, Montanaro L, Santini D, Chieco P, Bonafé M. The basal-like breast carcinoma phenotype is regulated by SLUG gene expression. *J Pathol.* 2008;214(1):25-37.

Summerfield, A.E., Hudnall A.K., Lukas T.J., Guyer C.A and Staros J.V. Identification of residues of the epidermal growth factor receptor proximal to residue 45 of bound epidermal growth factor. *J Biol Chem,* 1996; 271(33):19656-19659.

Suzuki R, Atherton AJ, O'Hare MJ, Entwistle A, Lakhani SR, y Clarke C. Proliferation and differentiation in the human breast during pregnancy differentiation. 2000;66(2-3):106-115.

Tanner M, Kapanen AI, Junttila T, Raheem O, Grenman S, Elo J, Elenius K, Isola J. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther.* 2004;3(12):1585-1592.

Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, Lewis A, Boshell M, Lane EB, y Leigh IM. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J Cell Sci.* 1989;94 (Pt 3):403-413.

Tsang RY, Finn RS. Beyond trastuzumab: novel therapeutic strategies in HER2-positive metastatic breast cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(1):6-13.

Valabrega G, Capellero S, Cavalloni G, Zaccarello G, Petrelli A, Migliardi G, Milani A, Peraldo-Neia C, Gammaitoni L, Sapino A, Pecchioni C, Moggio A, Giordano S, Aglietta M, Montemurro F. HER2-positive breast cancer cells resistant to trastuzumab and lapatinib lose reliance upon HER2 and are sensitive to the multitargeted kinase inhibitor sorafenib. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;130(1):29-40.

van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT,

Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002;415(6871):530-536.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, Torhorst J, Sauter G, Zuber M, Köchli OR, Mross F, Dieterich H, Seitz R, Ross D, Botstein D, Brown P. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2002;161(6):1991-1996.

Vanharanta S, Massagué J. Origins of metastatic traits. *Cancer Cell*. 2013;24(4):410-21.

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;126(2):355-364.

Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K; EMILIA Study Group. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;367(19):1783-1791.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(10):755-768.

Vivanco I, Sawyers C. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(7):489-501.

Vu-Nishino, H, Tavassoli, FA, Ahrens, WA, Haffty, BG. Clinicopathologic features and long-term outcome of patients with medullary breast carcinoma managed with breastconserving therapy (BCT). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2005;62(4):1040.

Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):R245-262.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Res*. 2010;12 Suppl 4:S5.

Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. 2000;287(5457):1442-1446.

Whittemore AS, Gong G, Itnyre J: Prevalence and contribution of BRCA1 mutations in breast cancer and ovarian cancer: results from three U.S. population-based case-control studies of ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 1997;60(3):496- 504.

Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(10):1566-1584.

Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology* (Bethesda). 2010;25(2):85-101.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*. 2013;31(31):3997-4013.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25(1):118-145.

Wong W, Bai XC, Brown A, Fernandez IS, Hanssen E, Condrón M, Tan YH, Baum J, Scheres SH. Cryo-EM structure of the *Plasmodium falciparum* 80S ribosome bound to the anti-protozoan drug emetine. *Elife*. 2014 Jun 9;3. doi: 10.7554/eLife.03080

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994;265(5181):2088-2090.

Xia W, Bisi J, Strum J, Liu L, Carrick K, Graham KM, Treece AL, Hardwicke MA, Dush M, Liao Q, Westlund RE, Zhao S, Bacus S, Spector NL. Regulation of survivin by ErbB2 signaling: therapeutic implications for ErbB2-overexpressing breast cancers. *Cancer Res* 2006;66(3):1640-1647.

Yamamoto N, Katakami N, Atagi S, Hida T, Goto K, Horai T, Inoue A, Ichinose Y, Kobayashi K, Takeda K, Kiura K, Saka H, Tamura T, Okamoto I, Nogami N, Moriga R, Nishio K, Seki Y, Lorence R, Shahidi M. A phase II trial of afatinib (BIBW 2992) in patients (pts) with advanced non-small cell lung cancer previously treated with erlotinib or gefitinib Poster presented at: the Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology June 4-8, 2011; Chicago, IL. Abstract 7524.

Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1986;319(6050):230-234.

Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001;2(2):127-137.

Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer*, 2004;4(2):97-105.

Zhang X, Gureasko J, Shen K, Cole PA, Kuriyan J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*. 2006; 125(6):1137-1149.

En Madrid, a 12 de Octubre de 2015

